

**CHARAKTERISIERUNG UND DIFFERENZIERUNG
VON EQUINEN INFLUENZA A VIREN (H3N8)
MIT MONOKLONALEN ANTİKÖRPERN**

THOMAS NOÉ

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

CHARAKTERISIERUNG UND DIFFERENZIERUNG
VON
EQUINEN INFLUENZA A VIREN (H3N8)
MIT MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Thomas Noé
aus
Rimpar

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: _____ Prof. Dr. H. Zucker

Referent: _____ Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: _____ Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: _____ 25. Juli 1986

1	Einleitung	1
2	Verzeichnis der	2
3	Verzeichnis der	3
4	Verzeichnis der	4
5	Verzeichnis der	5
6	Verzeichnis der	6
7	Verzeichnis der	7
8	Verzeichnis der	8
9	Verzeichnis der	9
10	Verzeichnis der	10
11	Verzeichnis der	11
12	Verzeichnis der	12
13	Verzeichnis der	13
14	Verzeichnis der	14
15	Verzeichnis der	15
16	Verzeichnis der	16
17	Verzeichnis der	17
18	Verzeichnis der	18
19	Verzeichnis der	19
20	Verzeichnis der	20
21	Verzeichnis der	21
22	Verzeichnis der	22
23	Verzeichnis der	23
24	Verzeichnis der	24
25	Verzeichnis der	25
26	Verzeichnis der	26
27	Verzeichnis der	27
28	Verzeichnis der	28
29	Verzeichnis der	29
30	Verzeichnis der	30
31	Verzeichnis der	31
32	Verzeichnis der	32
33	Verzeichnis der	33
34	Verzeichnis der	34
35	Verzeichnis der	35
36	Verzeichnis der	36
37	Verzeichnis der	37
38	Verzeichnis der	38
39	Verzeichnis der	39
40	Verzeichnis der	40
41	Verzeichnis der	41
42	Verzeichnis der	42
43	Verzeichnis der	43
44	Verzeichnis der	44
45	Verzeichnis der	45
46	Verzeichnis der	46
47	Verzeichnis der	47
48	Verzeichnis der	48
49	Verzeichnis der	49
50	Verzeichnis der	50
51	Verzeichnis der	51
52	Verzeichnis der	52
53	Verzeichnis der	53
54	Verzeichnis der	54
55	Verzeichnis der	55
56	Verzeichnis der	56
57	Verzeichnis der	57
58	Verzeichnis der	58
59	Verzeichnis der	59
60	Verzeichnis der	60
61	Verzeichnis der	61
62	Verzeichnis der	62
63	Verzeichnis der	63
64	Verzeichnis der	64
65	Verzeichnis der	65
66	Verzeichnis der	66
67	Verzeichnis der	67
68	Verzeichnis der	68
69	Verzeichnis der	69
70	Verzeichnis der	70
71	Verzeichnis der	71
72	Verzeichnis der	72
73	Verzeichnis der	73
74	Verzeichnis der	74
75	Verzeichnis der	75
76	Verzeichnis der	76
77	Verzeichnis der	77
78	Verzeichnis der	78
79	Verzeichnis der	79
80	Verzeichnis der	80
81	Verzeichnis der	81
82	Verzeichnis der	82
83	Verzeichnis der	83
84	Verzeichnis der	84
85	Verzeichnis der	85
86	Verzeichnis der	86
87	Verzeichnis der	87
88	Verzeichnis der	88
89	Verzeichnis der	89
90	Verzeichnis der	90
91	Verzeichnis der	91
92	Verzeichnis der	92
93	Verzeichnis der	93
94	Verzeichnis der	94
95	Verzeichnis der	95
96	Verzeichnis der	96
97	Verzeichnis der	97
98	Verzeichnis der	98
99	Verzeichnis der	99
100	Verzeichnis der	100

Zum Gedenken
an
Prof. Dr. P. A. Bachmann

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	3
2.1.	Charakterisierung der Influenzaviren	3
2.1.1.	Hämagglutinin	5
2.1.1.1.	Biosynthese	5
2.1.1.2.	Struktur	5
2.1.1.3.	Antigenität	7
2.1.1.4.	Funktion	8
2.1.2.	Neuraminidase	9
2.1.2.1.	Biosynthese	9
2.1.2.2.	Struktur	9
2.1.2.3.	Antigenität	10
2.1.2.4.	Funktion	11
2.2.	Methoden der Variationsuntersuchung	11
2.2.1.	Untersuchungen der RNA	12
2.2.2.	Untersuchungen der Strukturantigene	13
2.3.	Monoklonale Antikörper	14
2.3.1.	Definition und Herstellung	14
2.3.2.	Bedeutung	15
2.4.	Equine Influenzaviren	16
2.4.1.	Ökologie	16
2.4.2.	Epizootiologie	18
2.4.3.	Diagnose	19
2.4.4.	Immunologie	20
2.4.5.	Impfung	20
3.	Eigene Untersuchungen	22
3.1.	Material und Methoden	22
3.1.1.	Züchtung der equinen Influenza-Stämme	22
3.1.2.	Tween-Äther-Behandlung	22
3.1.3.	Herstellung monoklonaler Antikörper (MAK)	23
3.1.3.1.	Virusreinigung und Immunisierung	23

	Seite
3.1.3.2. Herstellung von Hybridomazellen	23
3.1.3.3. Isolierung antikörperproduzierender Kolonien	24
3.1.3.4. Klonierung	24
3.1.3.5. Produktion von Asciten	25
3.1.4. Reinigung monoklonaler Antikörper	26
3.1.4.1. Protein-A-Affinitätschromatographie	26
3.1.5. RDE-Behandlung	27
3.1.6. Nachweis der Spezifität monoklonaler Antikörper	27
3.1.6.1. Hämagglutinations-Inhibitionstest	28
3.1.6.2. Mikro-Neuraminidase-Test	28
3.1.6.3. Mikro-Neuraminidase-Inhibitionstest	31
3.1.6.4. Neutralisationstest	31
4. Ergebnisse	33
4.1. Herstellung monoklonaler Antikörper	33
4.2. Überprüfung der Spezifität hämagglutinations- hemmender MAK	34
4.2.1. Vergleichende Untersuchungen von Influenza A/ Equi-2-Stämmen mit MAK gegen das Hämagglutinin von A/Eq/Miami/1/63	35
4.2.1.1. Vergleichende Untersuchungen mit hitzeinakti- vierten Asciten	35
4.2.1.2. Vergleichende Untersuchungen mit RDE-behandelten Asciten	36
4.2.1.3. Vergleichende Untersuchungen mit Protein-A- gereinigten Asciten	40
4.2.1.4. Vergleichende Untersuchungen mit Protein-A- gereinigten und RDE-behandelten Asciten	40
4.2.2. Untersuchungen von Tween-Äther-behandelten In- fluenza A/Equi-2-Stämmen mit MAK gegen A/Eq/Miami/1/63	43
4.3. Überprüfung der Spezifität Neuraminidase-hemmender MAK	46

	Seite
4.3.1. Vergleichende Untersuchungen von Influenza A/ Equi-2-Stämmen mit MAK gegen die Neuraminidase von A/Eq/Miami/1/63	46
4.3.1.1. Vergleichende Untersuchungen mit inaktivierten Asciten	47
4.3.1.2. Vergleichende Untersuchungen mit RDE-behan- delten Asciten	49
4.3.1.3. Vergleichende Untersuchungen mit Protein-A- gereinigten Asciten	49
4.3.1.4. Vergleichende Untersuchungen mit Protein-A- gereinigten und RDE-behandelten Asciten	54
4.4. Neutralisationstest	56
5. Besprechung der Ergebnisse	58
6. Zusammenfassung	67
7. Literaturverzeichnis	71

1. Einleitung

Equine Influenza stellt weltweit ein ernstes Problem bei Renn- und Zuchtpferden dar. In beinahe regelmäßigen Abständen kommt es zu Ausbrüchen: 1976 und 1979 in England, 1979 in Schweden, 1980/81 in den USA und 1984/85 in Frankreich. Bisher waren jedesmal geimpfte wie nicht geimpfte Tiere betroffen.

Für solche Ausbrüche können vor allem drei Ursachen in Betracht kommen: zum ersten nachlässige Vakzinierung durch zu große Impfintervalle; zum zweiten zu geringe Immunogenität des in der Vakzine vorhandenen Virusmaterials; zum dritten eine unzureichende Immunität der Impflinge, resultierend aus einer raschen Variation der Pferdeinfluenzaviren.

Bei den während genannter Ausbrüche gewonnenen Virusisolaten handelt es sich zum überwiegenden Teil um equine Influenzaviren vom Subtyp 2.

Equines Influenzavirus vom Subtyp 2 verhält sich im Gegensatz zum Subtyp 1 antigenetisch nicht einheitlich. Ist ein Tier durch Immunisierung mit dem inaktivierten Referenzstamm A/Eq/Prague/1/56 (H7N7) gegenüber dem Subtyp 1 ausreichend geschützt, so muß eine Vakzine gegen den Subtyp 2 neben dem Referenzstamm A/Eq/Miami/1/63 (H3N8) immer mehrere, von diesem Stamm abweichende Varianten enthalten.

Es ist daher für die Labors, die sich mit der Kontrolle der equinen Influenzaviren beschäftigen, von Wichtigkeit, über die aktuelle epizootiologische Situation innerhalb der Pferdepopulation im Hinblick auf effektive Vakzinierung möglichst genau informiert zu sein.

Für Untersuchungen mit dieser Zielsetzung eignen sich am besten monoklonale Antikörper, die - wie man aus Untersuchungen von vor allem humanen Influenza A-Stämmen weiß - in ihrer Antigenspezifität polyklonalen Immunseren überlegen sind.

Aufgabe vorliegender Arbeit war es, monoklonale Antikörper (MAK) gegen das Hämagglutinin und die Neuraminidase des Referenzstammes A/Eq/Miami/1/63 herzustellen und mit ihrer

Hilfe eine Auswahl equiner H3N8-Stämme verschiedener Epizootien auf etwaige Antigendrift hin zu untersuchen. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die Reaktion der monoklonalen Antikörper mit Epitopen dieser beiden Enzyme durch verschiedene Reinigungsverfahren beeinflusst werden kann.

2. Schrifttum

2.1. Charakterisierung der Influenzaviren

Influenzaviren gehören zur Familie der Orthomyxoviridae, sind also behüllte Partikel mit segmentierter, einsträngiger RNA von negativer Polarität. Die RNA besteht aus 8 Segmenten (McGeoch et al., 1976) mit einem Gesamt-MG von 5×10^6 Dalton. Das Nukleokapsid ist helikalsymmetrisch, sein Strang hat einen Durchmesser von 9-15 nm. Die Virionen weisen pleomorphe Gestalt auf, ca. 80-120 nm im Durchmesser. Filamentöse Formen können bis zu mehreren Mikrometern lang sein. Durch Hitze (56°C; 30 Min.), pH-Werte von 3,0 sowie Äther- und Chloroformbehandlung wird die Infektiosität zerstört. Die Hülle der Virionen besteht aus einer Lipiddoppelmembran, auf der die Enzyme Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) als Projektionen verankert sind. Das Hämagglutinin wird vom RNA-Segment 4, die Neuraminidase vom RNA-Segment 5 kodiert. Unter der Lipidhülle liegt das Matrixprotein (M), kodiert von Segment 7, welches typspezifische antigene Eigenschaften besitzt, wie sie auch dem Nukleoprotein (NP) zugesprochen werden (Rhode et al., 1977).

Neben diesen vier Strukturantigenen kodiert die RNA auch noch für ein nichtstrukturelles Protein (NS) und für drei weitere Proteine (P1, P2, P3), die als Polymerasekomplex (Palese et al., 1977) für die Synthese neuer viraler RNA verantwortlich sind. Die Vermehrung viraler RNA sowie die Kapsidbildung finden im Zytoplasma infizierter Zellen statt, die Umhüllung durch "budding" an der Zellmembran.

Das Genus Influenzavirus wird eingeteilt in Typ A und B. Der Typ C besitzt keine Neuraminidase, und die RNA weist nur 4-6 Segmente auf. Er wird wahrscheinlich in ein eigenes Genus eingeteilt. Typ A und B unterscheiden sich in den typspezifischen inneren Antigenen, dem Matrixprotein (M) und dem Nukleoprotein (NP) (van Wyke et al., 1980). Der Typ B kommt fast ausschließlich beim Menschen vor und verursacht in erster Linie sporadische Grippeerkrankungen. Bei Typ B-Influenza ist die Varia-

tion der Antigene HA und NA gering, auch sind keine Subtypen definiert.

Die weitere Klassifizierung von Typ A-Influenzaviren erfolgt auf Grund der Variationsbreite der Hämagglutinine und Neuraminidasen in Subtypen. Bei der Neuraminidase wurden bisher 9, beim Hämagglutinin 13 Subtypen festgestellt. Innerhalb dieser Subtypen sind weitere Variationen möglich.

Die Bezeichnung eines Stammes setzt sich zusammen aus dem Typ (z.B. A), bei tierischen Isolaten aus der Herkunftsspezies (z.B. equi), dem Ort der Isolierung (z.B. Miami), eventuell der laufenden Nummer des Stammes am Isolierungsort (z.B. 1) sowie dem Jahr der Isolierung. In Klammern wird meist noch die für dieses Isolat zutreffende HA- und NA-Konfiguration angeführt: Influenza A/Equi/Miami/1/63 (H3N8). Nach der neueren Nomenklatur (Anonymous, 1980) werden HA und NA von Influenzastämmen, die von Menschen bzw. Tieren isoliert wurden, in einer Systematik zusammengefaßt.

Die Variationsfreudigkeit von Influenza A-Viren beruht auf zwei Mechanismen (Webster et al., 1982a): (a) Spontane Punktmutationen im Virusgenom können zu Änderungen in der korrespondierenden Aminosäuresequenz führen (antigenic drift). Der Austausch einer einzelnen Aminosäure auf der Oberfläche eines Strukturantigens kann schon zu einem Nichterkennen durch die Immunabwehr eines geimpften Tieres führen (Laver et al., 1979). Auf Grund dieses Selektionsvorteils kann sich diese Variante in Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern, die gegen das Ausgangsvirus gerichtet sind, vermehren. In der betroffenen Population kann es zu einer Epizootie kommen (Gerhard und Webster, 1978). Serologisch sind bei gedrifteten Varianten noch Kreuzreaktionen feststellbar. (b) Sind komplette Genomsegmente betroffen, führt dies zum plötzlichen Auftreten neuer Subtypen. Dieses Phänomen wird bei Mischinfektionen mit zwei verschiedenen Influenza A-Virusstämmen durch das segmentierte Genom ermöglicht. Rein rechnerisch bestehen 256 Austauschmöglichkeiten.

Nach dieser Rekombinantenbildung, die auch als genetic reassortment oder antigenic shift bezeichnet wird (Desselberger

et al., 1978), sind bei Strukturantigenen Kreuzreaktionen mit einem Elternvirus nicht mehr feststellbar.

Die beiden Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase sind von größter Bedeutung für die Charakterisierung von Influenzaviren; daher werden diese beiden Glykoproteine im Folgenden näher beschrieben.

2.1.1. Hämagglutinin

2.1.1.1. Biosynthese

Das Hämagglutinin (HA) wird vom RNA-Segment 4 (Rhode et al., 1977) kodiert und als Polypeptidkette synthetisiert. Während des intrazellulären Transports von Ribosomen zur Zellmembran wird die Polypeptidkette proteolytisch gespalten (Klenk et al., 1977) in ein hydrophiles aminoterminales Fragment HA1 mit einem MG von 47,000 und in ein carboxyterminales Fragment HA2 mit einem MG von 30,000. Diese MG-Angaben wurden für das Hämagglutinin H3 von A/HongKong/68 (H3N2) ermittelt (Laver et al., 1980; Ward, 1981). Das HA2-Fragment enthält den hydrophoben Anteil, mit dem das Hämagglutinin in der Virusmembran verankert ist. Die Spaltung der Peptidkette in diese beiden Monomere ist essentiell für das Fusionsvermögen des Hämagglutinins mit der Membran der Wirtszelle und somit für die Infektiosität (Huang et al., 1980a; Klenk et al., 1982).

2.1.1.2. Struktur

Strukturuntersuchungen des equinen Hämagglutinins H3 liegen nicht vor. Nach Scholtissek et al. (1977) besteht in den Sequenzen von Gen 4 80% Homologie zwischen Equi-2-Viren (H3N8) und dem HongKong-Virus (H3N2). Deshalb wird im Folgenden die Struktur des HongKong-Hämagglutinins geschildert.

Grundlegende Erkenntnisse bezüglich der dreidimensionalen Struktur des Hämagglutinins vom Subtyp H3 liefert die kristallographische Strukturanalyse von Wilson et al. (1981). Danach liegt das Hämagglutinin in Form eines Trimers vor.

Jedes Monomer baut sich aus zwei strukturell verschiedenen Einheiten auf, welche über Disulfid-Brücken verbunden sind: einer länglichen Stammstruktur, bestehend aus zwei antiparallel verlaufenden α -Helices mit einer Länge von ca. 76 Å, gebildet vom HA2-Fragment und einigen Aminosäuren von HA1, und einem globulären Gebilde, auf welchem die Wirtsrezeptorenbindende Region und die variablen antigenen Determinanten lokalisiert sind, zur Gänze vom HA1-Fragment gebildet (Abbildung 1).

Der für die Fusion des Virus mit der Wirtszellmembran verantwortliche Antigenabschnitt befindet sich am "Fußende" nahe der Virusmembran.

Die Monomere winden sich aus Stabilitätsgründen um 100° umeinander in Form einer linksläufigen Superhelix. Das distale Ende eines jeden Globus wird durch eine β -Struktur antiparallel gefalteter Aminosäuresequenzen gebildet, die den vermutlichen Rahmen für den Sialinsäurerezeptor darstellen.

Die vollständige Aminosäuresequenzanalyse des HongKong-Hämagglutinins (H3) wurde von Ward und Dopheide (1980) beschrieben.

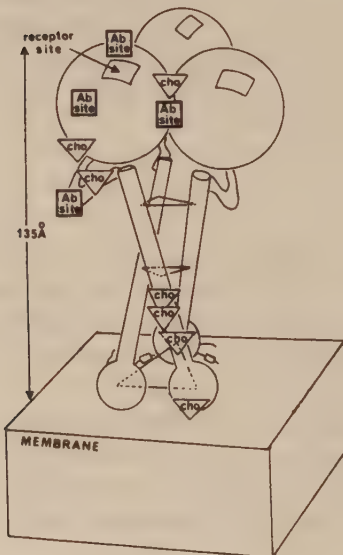


Abbildung 1:

Schematische Darstellung des Hämagglutintrimers von A/HongKong/68 (H3N2).

Mit "Ab site" werden Antigenorte bezeichnet, mit "cho" Kohlenhydratanlagerungen. Die an die Wirtszelle bindende Region ist als "receptor site" symbolisiert. Aus: Wilson et al. (1981).

2.1.1.3. Antigenität

Antigenetische Veränderungen im Hämagglutininmolekül sind epizootiologisch von großer Wichtigkeit, da die Infektiosität der Virionen durch Interaktionen mit dem HA-Molekül (und zwar mit dem HA1-Polypeptid) neutralisiert wird.

Laver et al. (1979) untersuchten die Aminosäuresequenzen im Hämagglutinin von H3-Varianten, die mit MAK gegen A/HongKong/68 (H3N2) selektiert worden waren. Dadurch wurde die Selektion von Mutanten in einer partiell immunen Wirtspopulation nachgeahmt. Sie fanden, daß Positiv- und Negativreaktion mit einem Antikörper auf dem Wechsel einer einzigen Aminosäure im HA1-Polypeptid beruhen kann. Im HA2-Polypeptid aller untersuchten Varianten wurde dagegen kaum eine Sequenzänderung festgestellt.

Nach Wiley et al. (1981) sind auf dem HongKong-Hämagglutinin (H3) vier Antigenorte identifizierbar: drei dieser "antigenic sites" befinden sich auf dem HA1-Fragment, der vierte auf einem Monomer am Übergang eines Globus zum HA2-Fragment (Abbildung 1). Diese Ergebnisse konnten von Breschkin et al. (1981) bestätigt werden. Diese Autoren vermuten eine größere antigenetisch determinante Region, die von hämagglutinationshemmenden und neutralisierenden MAK erkannt wird. Zwei weitere Orte, deren Bedeutung nicht vollständig klar ist, liegen unweit dieser Region. Dagegen wird eine vierte Region von MAK erkannt, die keine hämagglutinationshemmende oder neutralisierende Aktivität besitzen.

Underwood (1982) erweitert die Vorstellung von den vier Antigenorten dahingehend, daß er ein zusammenhängendes Areal von Aminosäuren um den sich konkav einbuchtenden Zellrezeptor-Ort herum vermutet, von dem die Antikörperbindung beeinflußt wird. Die tatsächlich Antikörper-bindenden Strukturen können innerhalb dieses Areals diskret liegen oder sich überlappen. Unterschiedliche Antigenität kann nach Wiley et al. (1981) und Caton et al. (1982) nicht nur aus unterschiedlicher Aminosäuresequenz resultieren, sondern auch aus der Maskierung eines Aminosäurerestes durch Oligosaccharidketten. Dadurch

kann die Erkennung eines Epitops aus sterischen Gründen verhindert werden.

Konformationsänderungen des HA-Moleküls durch gleichzeitiges Binden zweier MAK an verschiedenen Antigenorten wurden von Lubeck und Gerhard (1982) beschrieben. Dabei stellten sie eine Veränderung der Avidität dieser MAK fest. Welche Bedeutung diese Beobachtung für die Reaktionen polyklonaler Antikörper hat, ist nicht geklärt.

2.1.1.4. Funktion

Nach Daniels et al. (1983), Jackson et al. (1983) und Jackson und Nestorowicz (1985) ist das Hämagglutinin primär verantwortlich für die Adsorption des Virus an die Zelloberfläche durch den receptor binding site auf dem Globus jedes Monomers. Zur Adsorption bindet das HA an sialinsäurehaltigen Rezeptoren der Zelloberfläche. Dann penetriert das Virus die Zellmembran durch Viropexis (Endozytose des intakten Virions) und liegt nun in einem endosomalen Vesikel im Zytoplasma (Marsh, 1984). Wahrscheinlich auf Grund einer Protonenpumpe (Daniels et al., 1983) sinkt der pH an der Innenseite der Vesikelmembran in den Bereich 6,2 bis 5,0. Infolge der pH-Senkung kommt es zu einer Konformationsänderung des Trimers: die drei globulären Regionen weichen ähnlich den Blütenblättern einer Tulpe auseinander und ermöglichen so den erforderlichen engen Kontakt des HA2-Moleküls, das am "Fußende" des Hämagglutinins sitzt, mit der Zellmembran. Bedingung hierfür ist die Spaltung des Hämagglutinins in das HA1- und das HA2-Fragment. Die Verschmelzung der Virushülle mit der Vesikelmembran wird dann durch eine NH_2 -terminale Region des HA2-Moleküls vermittelt. Werden jedoch die Disulfid-Brücken, die die Stammstruktur mit dem Globus des HA verbinden, durch reduzierende und alkylierende Substanzen zerstört (Arcus und Knight, 1981), kommt es zu einem irreversiblen Verlust der Aktivität des Hämagglutinins.

Auf Grund der überragenden Funktion des HA-Moleküls stellen Yoden et al. (1985) die Neutralisierung dieses Antigens auch bei der Neutralisierung der Infektiosität in den Vordergrund.

Sie diskutieren dabei drei Möglichkeiten: (a) Antikörper blockieren direkt den "receptor binding site" auf der HA1-Kette, und (b) sie blockieren den Fusionsschritt, d.h. die Konformationsänderung bei saurem pH. Außerdem wird (c) eine Beeinflussung der Transkriptase-Aktivität in der infizierten Zelle erwogen.

2.1.2. Neuraminidase

2.1.2.1. Biosynthese

Die Neuraminidase (N8) von A-Equi-2-Viren wird vom RNA-Segment 5 kodiert (Rhode et al., 1977). Untersuchungen der Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen verschiedener NA-Subtypen liegen vor (Blok und Air, 1980a, 1980b, 1982a, 1982b).

2.1.2.2. Struktur

Das gegenwärtige Wissen über die Struktur der Neuraminidase beruht vor allem auf den kristallographischen Strukturanalysen von N2 (Varghese et al., 1983; Colman et al., 1983; Wiley, 1983). Strukturanalysen von N8 liegen nicht vor, jedoch kann davon ausgegangen werden, daß zumindest innerhalb der Grobstruktur Kongruenz zwischen den N-Subtypen besteht.

Nach Varghese et al. (1983) liegt das Glykoprotein NA in Form eines in sich symmetrischen Tetramers vor, wobei die einzelnen Monomere ähnlich einer vierblättrigen Blüte über einen langen, schlanken Stiel mit der Virusoberfläche verbunden sind (Abbildung 2). Jedes Monomer besteht aus sechs antiparallel verlaufenden, viersträngigen β -Ketten. In der Aufsicht erscheinen die sechs β -Ketten eines Monomers in ihrer Anordnung wie die sechs Blätter eines Propellers. Diese Propellerstruktur wird von Varghese et al. (1983) für alle Neuraminidase-Subtypen vermutet.

Auf der Oberfläche eines jeden Monomers befindet sich eine Vertiefung. Diese stellt den enzymatisch wirksamen Bereich (sialic acid binding site) dar.

Der innere Zusammenhalt des Tetramers wird vermutlich durch Kalzium-Ionen gewährleistet. Der dünne Stiel ist im Gegensatz zum Hämagglutinin (C-terminal) N-terminal in der Virionmembran verankert. Die Aminosäuresequenz des Stiels ist bei den ersten 12 Aminosäuren aller 9 Subtypen identisch, wohingegen die Sequenz zwischen Säurerest 36 bis 73 bei allen Subtypen verschieden ist (Anonymous, 1981a; Wiley, 1983). Vergleicht man die Sequenzen des restlichen Molekülanteils, so liegt hier wieder Homologie von mehr als 50% vor (Blok und Air, 1982a; Wiley, 1983).

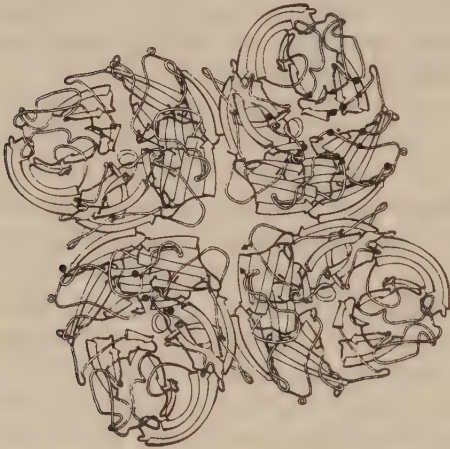


Abbildung 2:
Darstellung des Neura-
minidase-Tetramers (N2)
bei Aufsicht auf die
Symmetrieachse des Mo-
leküls.
Aus: Varghese et al.
(1983).

2.1.2.3. Antigenität

Die antigenetischen Determinanten bilden einen fast zusammenhängenden Bereich, der sich kreisförmig um die enzymatisch wirksame Einbuchtung auf der Oberfläche eines jeden Monomers erstreckt (Colman et al., 1983). Eine Unterscheidung zwischen dem enzymatischen Zentrum und den antigenen Determinanten forderte schon Fazekas de St.Groth (1963). Webster et al. (1982b) und Air et al. (1985) konnten bei verschiedenen Varianten, die in Anwesenheit monoklonaler Antikörper vermehrt

worden waren, zeigen, daß wie beim Hämagglutinin Positiv- oder Negativreaktionen mit MAK auf dem Austausch einer einzigen Aminosäure beruhen können.

Von der Neuraminidase des Subtyps 2 weiß man, daß Veränderungen im Sinne einer antigenetischen Drift bevorzugt auf den oberflächlich liegenden Schleifen, welche die verschiedenen Stränge der β -Ketten verbinden, stattfinden (Colman et al., 1983).

2.1.2.4. Funktion

Die präzise Rolle der Neuraminidase im Rahmen der viralen Infektion ist noch nicht klar (Air et al., 1985). Anti-Neuraminidase-Antikörper vermögen das Virus nicht zu neutralisieren, jedoch die Freisetzung von Virus aus infizierten Zellen zu mindern (Kilbourne et al., 1968). Webster et al. (1984) konnten jedoch zeigen, daß Anti-Neuraminidase-Antikörper in sehr hoher Konzentration Virus-neutralisierende Aktivität besitzen. Das Glykoprotein scheint sowohl den Virustransport in die Zelle hinein als auch durch die Spaltung von Sialinsäure an Zellrezeptoren die Freisetzung von Nachkommenvirus aus der Zelle heraus zu unterstützen. Weiterhin verhindert die Abspaltung von Sialinsäure vom Kohlehydratanteil neu synthetisierter Hämagglutinin- und Neuraminidasemoleküle eine Aggregation von Nachkommenvirus innerhalb der infizierten Zelle (Huang et al., 1980b ; Colman et al., 1983)

2.2. Methoden der Variationsuntersuchung

Die Variation der Influenza A-Viren betrifft primär das Genom der Viren, in der Regel aber auch die viralen Proteine, vor allem die beiden eben geschilderten Oberflächenantigene. Untersuchungen zum Nachweis dieser Variationen können sich also sowohl mit genetischen Veränderungen als auch mit den Veränderungen der Proteine beschäftigen. Erstere liefern zwar die genaueren und letztlich endgültigen Ergebnisse, für epizoo-

tiologische Fragestellungen (z.B. die Zusammensetzung von Impfstoffen) sind aber Kenntnisse über die antigenetischen Variationen gleichermaßen von großer Wichtigkeit. Im Folgenden sind die bei den beiden Strategien angewandten Methoden kurz aufgeführt.

2.2.1. Untersuchungen der RNA

Eine Technik, mit deren Hilfe komplette RNA oder RNA-Segmente analysiert werden können, stellt das Oligonucleotide Mapping (Oligonucleotide fingerprint analysis) dar. Man versteht darunter die sequenzspezifische enzymatische Spaltung der Nukleinsäure und die anschließende zweidimensionale Auftrennung der Spaltprodukte mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) (de Wachter und Fiers, 1972; Cox et al., 1983).

Die Nukleinsäurehybridisierung stellt eine hochsensible molekularbiologische Methode dar, mit deren Hilfe man Basensequenzhomologien bei viraler RNA (vRNA) von verschiedenen Isolaten feststellen kann. Man hybridisiert vRNA mit komplementärer RNA (cRNA) bzw. mit der vRNA eines heterologen Isolats, wobei ein Reaktionspartner radioaktiv markiert ist.

Ein solcher Doppelstrang kann nun mit einer Ribonuklease (S1-Nuklease), die nur Einzelstrang-RNA hydrolysiert, versetzt und dann mittels PAGE überprüft werden. Je nach Homologie ist der Doppelstrang resistent gegen die Ribonuklease (Hay et al., 1977; Ghendon et al., 1981).

Bei der RNA-RNA-Hybridisierung (Scholtissek et al., 1976; Scholtissek, 1980) wird die nach der Verdauung mit RNase A durch Säure ausfällbare Radioaktivität gemessen.

Bei einer homologen Reaktion ist diese identisch mit dem radioaktiven Input, in einem heterologen System hängt sie von der Basensequenzhomologie ab.

Auch bei der DNA-RNA-Hybridisierung (Nerome et al., 1983) findet dieses Prinzip Verwendung. Hierbei wird Virus-RNA mit Hilfe reverser Transkriptase in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben und mit nicht markierter vRNA hybridisiert.

Bei der kompetitiven RNA-RNA-Hybridisierung (Bean et al., 1980) wird radioaktiv markierte vRNA mit homologer cRNA

hybridisiert. Durch Zugabe im Überschuß von nicht markierter heterologer vRNA und gleichzeitiger Erwärmung des RNA-Doppelstranges wird die homologe markierte vRNA kompetitiv verdrängt. Das Ausmaß der kompetitiven Verdrängung entspricht der Sequenzhomologie.

Exakte Informationen über das Variationsgeschehen bei Influenzaviren vermitteln Nuklein- bzw. Aminosäuresequenzanalysen (Scholtissek et al., 1977; Ward und Dopheide, 1980). Diese korrespondierenden Verfahren sind sehr komplex und erfordern großen technischen Aufwand. Auf technische Details soll hier nicht näher eingegangen werden (Lit. bei Rickwood und Hames, 1982).

2.2.2. Untersuchungen der Strukturantigene

Das neue Nomenklatorsystem für Influenzaviren basiert auf dem Double Immunodiffusion-Test (DID) (Anonymous, 1980; Schild et al., 1980). Beim DID-Test diffundieren in halbflüssigem Agar-Gel zu testende Isolate gegen antigenspezifische Hyperimmunseren. Ähnlichkeiten bzw. Gemeinsamkeiten zwischen Antigenen und dem jeweiligen Serum kommen in Form von Präzipitationslinien zur Beobachtung. Bei Variation innerhalb der Antigene werden nur sehr zarte oder überhaupt keine Linien sichtbar. Dieses Verfahren dient hauptsächlich zum Nachweis von M-Proteinen.

Hämagglutinations-Inhibitions- und Neuraminidase-Inhibitionstests (Palmer et al., 1975; Aymard-Henry et al., 1973) sind die gebräuchlichsten Tests zur Untersuchung dieser Oberflächenantigene. Sie basieren auf der spezifischen Hemmung der Enzymaktivitäten. Schon geringgradige Variationen können mit Hilfe dieser Verfahren nachgewiesen werden. Die Seren für diese Tests werden meist durch Infektion bzw. Immunisierung von Frettchen hergestellt.

Die Reaktivität von Antikörpern mit verschiedenen Virusstämmen kann auch im ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) gemessen werden (Kida et al., 1982; Denyer et al., 1984). Dieser Test zeichnet sich durch hohe Sensitivität

aus, ist rasch durchführbar und erlaubt die gleichzeitige Untersuchung einer großen Anzahl von Proben. Er weist aber auch eine Reihe von Nachteilen auf: bei der Verwendung von MAK treten häufig starke nicht spezifische Hintergrundreaktionen auf. Polyklonale Seren müssen meist extensiv mit heterologen Viren adsorbiert werden, um spezifische Ergebnisse zu erzielen.

Hohe Empfindlichkeit ist das Charakteristikum des Radioimmuntests (RIT; engl. RIA). Bei diesem Test wird entweder der Antikörper durch ^{125}J (Breschkin et al., 1981) oder das Antigen durch ^{35}S -Methionin (van Wyke et al., 1980) in vitro radioaktiv markiert. Der große Vorteil dieses Tests ist seine Unabhängigkeit von Konformationsänderungen. So kann zum Beispiel das Binden von Antikörpern an der Neuraminidase nachgewiesen werden, die deren enzymatische Aktivität nicht beeinträchtigen.

Equines Influenzavirus kann in bebrüteten Hühnereiern und in Zellkulturen vermehrt werden. Beschrieben wurde dies für MDCK-Zellen (Nath und Minocha, 1977) und für ESK-Zellen (Yamagishi et al., 1981). Von den letztgenannten Autoren wurde ein Mikro-Neutralisationstest entwickelt, der zum Nachweis neutralisierender Antikörper herangezogen werden kann. Auf Grund der hohen Spezifität solcher Antikörper bietet sich dieser Neutralisationstest als ein weiteres Verfahren zur Feststellung antigenetischer Variation bei equinen Influenzaviren an.

2.3. Monoklonale Antikörper

2.3.1. Definition und Herstellung

Antikörper aus dem Serum immunisierter Tiere sind polyklonal, da sie von einer Population verschiedener B-Lymphozyten gebildet werden. Solche Antikörper sind heterogen, sie reagieren also mit unterschiedlichen Antigenregionen.

Unter einem Klon versteht man eine Population genetisch identischer Individuen. Monoklonale Antikörper sind Immun-

globuline, die von einem Klon produziert werden, der aus der Nachkommenschaft einer einzigen Zelle besteht, und von der man weiß, daß sie genetisch stabil ist.

Die Produktion, Selektion und Züchtung solcher Antikörperproduzierender Zellen (B-Zell-Hybridomas) ist nur in vitro möglich. Die theoretisch erzielbare Antikörpermenge ist unter der Voraussetzung einer genetischen Stabilität unbegrenzt.

Die Methodik zur Herstellung von Hybridomas wurde von Köhler und Milstein (1975) entwickelt und von Fazekas de St.Groth und Scheidegger (1980) und Pollock et al. (1984) eingehend beschrieben.

2.3.2. Bedeutung

Der große Vorteil der Hybridoma-Technologie besteht in der Homogenität und der unbegrenzten Verfügbarkeit der Antikörper. Auf Grund ihrer Spezifität sind MAK in der Lage, subtilste Veränderungen an antigenen Determinanten zu erkennen (Yolken, 1983; Pollock et al., 1984), bis zur Substitution einer einzigen Aminosäure innerhalb eines Proteins (Laver et al., 1980).

MAK bieten sich daher als geeignetes Instrument an, geringgradige Veränderungen an Oberflächenantigenen von Influenzaviren zu untersuchen, wie sie während einer Antigendrift stattfinden (Hinshaw et al., 1983; Pereira et al., 1985). Bei Untersuchungen dieser Art sind sie polyklonalen Antisera hoch überlegen.

Nach Jerne (1960) werden die antigenen Bindungsstrukturen mit dem Begriff "Epitop", die dazu passende Bindungsstruktur am Antikörper mit dem Begriff "Paratop" bezeichnet.

Pollock et al. (1984) unterscheiden sequentielle Epitope, also die lineare Sequenz von Aminosäuren, und konformationelle Epitope, also eine dreidimensionale Struktur der Bindungsstelle.

Liegen die Aminosäuren linear innerhalb der dreidimensionalen Struktur, so spricht man von einem kontinuierlichen

konformationellen Epitop. Bilden dagegen räumlich getrennte Sequenzen, d.h. zwei verschiedene Polypeptidketten nur auf Grund der Faltung eine gemeinsame Struktur, so spricht man von diskontinuierlichen konformationellen Epitopen. Gruppen von Epitopen, die auf einem Protein liegen, sich aber topologisch nicht überlappen, bilden sogenannte Antigenorte (antigenic sites; Yewdell und Gerhard, 1981).

2.4. Equine Influenzaviren

2.4.1. Ökologie

Equine Influenzavirusinfektion wird durch zwei Subtypen innerhalb des Typs A hervorgerufen. Der Subtyp 1 wird repräsentiert durch den Referenzstamm A/Eq/Prague/1/56 (H7N7), Subtyp 2 durch A/Eq/Miami/1/63 (H3N8).

Bisher wurde noch keine Influenzaepizootie bei Pferden beobachtet, die nicht von einem Stamm, der mit diesen beiden Subtypen verwandt ist, hervorgerufen wurde.

Subtyp 1: Der Subtyp 1 wurde erstmals von Sovinova et al. (1958) beschrieben. Seine Verbreitung, die Viruspersistenz in der Natur, seine Verwandtschaftsbeziehungen zu anderen Influenzaviren und vor allem seine Epizootiologie werden von Tumova (1980) und Tumova et al. (1980) erschöpfend beschrieben. Es sei an dieser Stelle jedoch nochmals auf die antigenetische Stabilität des Subtyps Equi-1 hingewiesen, die daraus ersichtlich wird, daß erst 23 Jahre nach Isolation des Originalstammes Isolate gewonnen werden konnten, welche eine geringgradige Drift von A/Eq/Prague/1/56 aufwiesen (Tumova et al., 1980). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Powell et al. (1974) und Rose et al. (1974) bei Equi-1-Epizootien in England.

Subtyp 2: Equines Influenzavirus vom Subtyp 2 wurde erstmals 1963 von Waddel et al. (1963) in Miami bei einer Epizootie isoliert. Dieser Subtyp kann entweder alleine für eine Epizootie verantwortlich sein - was weitaus am häufigsten der Fall ist (Pereira et al., 1972; Thomson et al., 1977; Klingeborn et al.,

1980; Burrows et al., 1981; Hinshaw et al., 1983) - oder er tritt zusammen mit dem Subtyp 1 in ein und derselben Epizootie auf (Tumova 1980). Die Verbreitung des Subtyps 2 ist wie die des Subtyps 1 weltweit. Australien scheint der einzige noch freie Kontinent zu sein (Tumova et al., 1982). Im Hinblick auf das Hämagglutinin bestehen Beziehungen zu aviären H3N8-Stämmen (z.B. A/Duck/Ukraine/1/63; H3N8) und zum humanen Subtyp H3N2, dem HongKong-Virus. Die Empfänglichkeit des Pferdes für humane H3N2-Stämme wurde beschrieben (Kasel und Couch, 1969), eine Übertragung von Pferd zu Pferd jedoch noch nie.

Es wird diskutiert, daß das humane HongKong-Virus durch Rekombination des bis 1968 vorherrschenden H2N2-Stammes mit einem animalen Stamm, einem aviären oder einem Equi-2-Stamm entstanden ist (Tumova, 1980; Ward und Dopheide, 1981). Vergleichende Sequenzanalysen von Gen 4 zwischen A/Eq/Miami/1/63 (H3N8) und A/HongKong/68 (H3N2) ergab eine Homologie von 80%, zwischen A/HongKong/68 (H3N2) und A/Duck/Ukraine/63 (H3N8) eine Homologie von 92% (Scholtissek et al., 1977). Als Vektoren für Equi-2-Viren werden Wildvögel diskutiert (Tumova, 1980). So wurden in den Jahren 1960-64 bei einer nahezu isolierten Pferdeherde in der Mongolei bei 12 von 142 Tieren Antikörper gegen Equi-2-Virus nachgewiesen. Die genetischen Variationsmöglichkeiten, die sich über solche Vektoren ergeben, werden von Sriram et al. (1980) angedeutet: H3N8-Feldisolate, die innerhalb einer einzigen Entenpopulation gewonnen wurden und die mit RNA-Gelelektrophorese und RNA-RNA-Hybridisierung untersucht worden waren, wiesen zum Teil überraschende Heterogenität auf, die aus parallel durchgeführten Hämagglutinations- und Neuraminidase-Inhibitionstests nicht ersichtlich war.

2.4.2. Epizootiologie

Equine Influenzaviren sind hochkontagiös und werden durch häufiges Aushusten von infektiösem Aerosol verbreitet. Während des Inkubationsstadiums und mindestens bis zum 5.Tag nach Auftreten klinischer Symptome kommt es zur Ausscheidung von Virus mit dem Nasensekret (Bachmann, 1984). Das Maximum der Virusausscheidung liegt zwischen dem dritten und sechsten Tag post infectionem (Burrows et al., 1981).

Die Übertragung verläuft überwiegend aerogen über Tröpfcheninfektion und wird durch engen Kontakt zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren beschleunigt. Ein besonderes Risiko besteht somit für Pferde, die aus verschiedenen Ställen oder Gegenden z.B. anlässlich von Auktionen oder Ausstellungen auf relativ engem Raum zusammenkommen. Da solches heutzutage auch auf internationaler Ebene bei Renn- und Zuchtveranstaltungen stattfindet, nahm die früher enzootische Seuche einen epizootischen, teilweise sogar pandemischen Charakter an (Bachmann, 1984). Epizootien sind somit meist in der Rennsaison zwischen April und Oktober zu beobachten. Internationale Veranstaltungen bieten zudem - zumindest theoretisch - enorme Rekombinationsmöglichkeiten. Neben der oben angesprochenen Möglichkeit einer Viruspersistenz in aviären Populationen werden von Tumova (1980a), Burrows et al. (1982) und Bachmann (1984) vor allem das Persistieren von Virus in Form klinisch inapparenter Infektionen innerhalb einer Pferdepopulation vermutet. Daß hiervon auch geimpfte Tiere betroffen sein können, beweisen Serumuntersuchungen bei vakzinierten Tieren: bei 10 von 12 Pferden, bei denen im Abstand von vier Wochen Blutproben genommen wurden, wiesen hohe Serum-HI-Titer (exakte Werte leider nicht angegeben) auf eine vor kurzem erfolgte Infektion hin. Während dieser vier Wochen zeigten die Tiere keinerlei diesbezügliche Symptome und arbeiteten zufriedenstellend (Burrows et al., 1982). Diese Ergebnisse konnten von Mumford et al. (1983) bestätigt werden, die bei 14 von 16 geimpften seropositiven Tieren Virusausscheidung

nach experimenteller Infektion nachweisen konnten.

Als auslösende Faktoren für Epizootien können somit neben allen sich immunsuppressiv auswirkenden Einflüssen wie schlechten Haltungsbedingungen, Trainings- und Transportstreß, auch das allmähliche Nachschieben von nicht immunen jungen Tieren in Betracht kommen, bei denen das Virus vorzüglich angehen kann, und von denen es dann auf die geimpften Tiere in vielfach erhöhter Infektionsdosis zurückgegeben wird.

Burrows et al. (1982) bezogen in ihre Untersuchungen von 18 Ställen, in denen Influenzainfektionen nachgewiesen werden konnten, weitere virale Erkrankungen des Respirationstraktes mit ein und kamen zu der Vermutung, daß Influenzainfektionen häufig in Form von Superinfektionen mit anderen Viren, z.B. Rhinoviren, überlagert werden bzw. selbst den Streßfaktor für die Reaktivierung einer latenten EHV-1 Infektion darstellen können.

2.4.3 Diagnose

Die Bestätigung einer Verdachtsdiagnose geschieht entweder durch Virusisolierung (Verimpfung einer Nasentupferprobe auf 10-11 Tage alte bebrütete Hühnereier) oder durch Nachweis eines Antikörperanstieges bei Serumpaaren. Dieser wird in der Regel durch den Hämagglutinations-Inhibitionstest (HI) geführt, wobei Seren vor dem Test zur Entfernung unspezifischer Inhibitoren sowie von Isoagglutininen mit RDE (Receptor-destroying enzyme) oder anderen Agentien behandelt werden. Weitere Nachweismöglichkeiten bieten die Radiale Gelhämolysetechnik (Schild et al., 1975; Yamagishi et al., 1982) mit unbehandelten Seren, die Immunodiffusion (Schild et al., 1971) und die Komplementbindungsreaktion (KBR). Die Anwendung dieser Methode ist jedoch begrenzt, da nur IgM und bestimmte Subklassen von IgG Komplement binden. Zudem fallen Antikörper, die mittels KBR nachgewiesen werden können, post infectionem rasch ab. Die KBR dient vor allem zur Untersuchung interner Proteine (Schild, 1972).

Eine neuere Möglichkeit des Antikörpernachweises bietet der Enzyme-linked immunosorbent assay (Denyer et al., 1984). Die Methode der Wahl ist aber nach wie vor der HI-Test.

2.4.4. Immunologie

Bei infizierten Tieren treten Antikörper gegen das NP- und M-Antigen 4-6 Tage post infectionem mit einem Höhepunkt zwischen dem 12. und dem 20.Tag auf. Diese Antikörper sind für den Immunschutz ohne Bedeutung.

Neutralisierende und hämagglutinationshemmende Antikörper dagegen können ca. ab dem 12.-15.Tag post infectionem nachgewiesen werden, mit einem Höhepunkt am 20.Tag und einem darauffolgenden langsamen Absinken (Bachmann, 1984).

Tiere mit einem HI-Antikörpertiter von $\geq 1:40$ gegen A/Eq/Miami/1/63 gelten als geschützt gegen Reinfektionen mit dem Subtyp 2. Eine Immunität gegen den Subtyp 1 besteht in der Regel länger als gegen den Subtyp 2 (Bommeli et al., 1980; Bachmann, 1985, pers. Mitteilung).

Via Kolostrum werden humorale Antikörper auf das Fohlen übertragen, wodurch dieses mehrere Monate geschützt ist (Thein, 1982). Dagegen berichten Liu et al., (1985) nur von einer kurzdauernden passiven Immunität des Fohlens durch kolostrale Antikörper. Nach ihren Untersuchungen sind Fohlen bereits nach 2-4 Wochen wieder empfänglich. Neutralisierende, sekretorische IgA-Antikörper beim Pferd wurden ebenfalls beschrieben (Pahud und Mach, 1972).

2.4.5. Impfung

Prophylaktische Impfungen stellen den besten Schutz vor Influenzaerkrankungen dar. Nach Mayr (1970) unterscheidet man Vollantigenimpfstoffe (das Virus wird mit Formalin inaktiviert und an Aluminiumhydroxid adsorbiert) und Spalt- oder Subunitimpfstoffe (die Infektiosität des Virus wird mit einer Tween-Äther-Mischung zerstört und das Virus dann mit Adjuvantien versetzt). Hauptsächlich werden Vollantigene

verwendet.

Thein (1982) schlägt eine Grundimmunisierung im 4. bzw. 5. Lebensmonat vor, gefolgt von einer 2. Impfung nach 8-12 Wochen. Sechs Monate später sollte die erste Wiederholungsimpfung stattfinden. Revakzinierungen sind dann nur noch alle neun Monate notwendig. Dieselben Intervalle sind auch bei älteren Tieren beizubehalten.

Witherspoon (1984) empfiehlt die erstmalige Applikation einer inaktivierten Influenza-Vakzine zusammen mit einer EHV-1-Lebendvakzine am 90. Lebenstag des Fohlens, gefolgt von Boosterungen in Intervallen von 30 bzw. 60 Tagen. Zuchtstuten sollten vier Mal jährlich geimpft werden, egal ob trächtig oder nicht. Diese kurzen Impfintervalle korrelieren mit den Erkenntnissen von Wood et al. (1983), die bei Impfstudien einen raschen und deutlichen Abfall der postvakzinalen Serumantikörper feststellen konnten.

Bei einer Impfstudie von Mumford et al. (1983) waren von 40 mit A/Eq/Miami/1/63 (H3N8) geimpften Tieren nur zwei Tiere völlig gegenüber der Infektion mit A/Eq/ Newmarket/79 geschützt. Diese beiden Tiere besaßen extrem hohe Antikörpertiter (Hämolysenhof im SRH $>65 \text{ mm}^2$). Bei den übrigen Tieren waren die klinischen Symptome und die Dauer der Virusausscheidung im Vergleich mit der nicht geimpften Kontrollgruppe signifikant vermindert.

Bei diesen Untersuchungen über die Wirksamkeit von Impfstoffen wurden nur die humoralen Antikörper bewertet, nicht dagegen andere Faktoren, die bei der Impfabwehr eine bedeutende Rolle spielen können, z.B. sekretorische Antikörper oder zytotoxische T-Lymphozyten.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Züchtung der equinen Influenza-Stämme

Die Influenza A/Equi-2-Stämme wurden auf 10-11 Tage alten bebrüteten Hühnereiern vermehrt. Die Allantoisflüssigkeit wurde steril geerntet und über Nacht bei -70°C eingefroren. Dann wurde die Allantoisflüssigkeit von ausgefallenen Proteinen durch 40-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4000 U/Min. (MSE Kühlzentrifuge) geklärt.

Das Virusmaterial der zu untersuchenden Pferdestämme wurde mindestens dreimal in 10-11 Tage alten embryonierten Hühnereiern passagiert. Als Testmaterial diente klare Allantoisflüssigkeit, welche nach Einfrieren bei -70°C und Zentrifugation bei 4000 Umdrehungen (MSE Kühlzentrifuge) in 2 ml-Portionen bei -70°C gelagert wurden.

3.1.2. Tween-Äther-Behandlung

Schon Berlin et al. (1963) beschrieben eine Erhöhung des HI-Titers, wenn man für den Test mit Äther behandelte Allantoisflüssigkeit verwendet. Modifiziert wurde diese Methode von John und Fulginiti (1966) durch den Zusatz eines Detergenz (Tween 80). In Anlehnung an diese Verfahren wurde die Tween-Äther-Behandlung durchgeführt:

15 ml vorgereinigte Allantoisflüssigkeit wurden mit 0,18 ml Tween 80 1%ig (Fa. Serva, Heidelberg) und 6,0 ml Äther (Fa. Hoechst, Mannheim) in einem Plastikzentrifugenglas mit Schraubdeckel gemischt. Diese Mischung ließ man bei Zimmertemperatur 15 Min. stehen, wobei öfter geschüttelt wurde, um eine möglichst homogene Mischung zu erreichen. Anschließend wurde 15 Min. bei 500g zentrifugiert. Im Zentrifugenglas bildeten sich drei Fraktionen: eine obere, bestehend aus Äther, eine dünne opake Zwischenphase und eine untere, virushaltige. Diese wurde sehr sorgfältig abgesaugt, im HA-Test überprüft und bei 4°C gelagert.

3.1.3. Herstellung monoklonaler Antikörper (MAK)

3.1.3.1. Virusreinigung und Immunisierung

Zur Immunisierung von Mäusen wurde der Virusstamm A/Eq/Miami/1/63 verwendet. Nach der primären Reinigung wurde der Überstand in der Ultrazentrifuge sedimentiert (Fa. Beckmann, Rotor 45 Ti, 90 Min. 30000 U/Min.). Nach Abkippen des Überstandes wurden die Pellets über Nacht mit je 0,5 ml TEN-Puffer geweicht. Daraufhin wurden die Pellets suspendiert, gepoolt und für drei Sekunden mit Ultraschall behandelt (Fa. Branson).

Nach der Abtrennung nicht löslicher Bestandteile (2200g/10 Min.) wurde der Überstand auf einen vorgeformten Sucrosegradienten überschichtet (20-60% Sucrose in TEN-Puffer) und drei Stunden in einem SW 56-Rotor (Fa. Beckmann) bei 25000 U/Min. zentrifugiert. Von den beiden im Röhrchen entstehenden Banden wurde die untere nach Punktion von der Seite abgesaugt. Anschließend erfolgte die Titerbestimmung des gereinigten Virusmaterials im Hämagglutinationstest (HA).

Zur Grundimmunisierung wurden 0,1 ml gradientengereinigtes Virusmaterial (HA-Titer 1:1000) zusammen mit 0,1 ml komplettem Freund'schen Adjuvans intraperitoneal verabreicht. Sechs und acht Wochen später folgte eine Reimmunisierung mit 0,2 ml gradientengereinigtem Material (HA-Titer 1:10000). Drei bis vier Tage nach der letzten Injektion wurde die Fusion durchgeführt.

3.1.3.2. Herstellung von Hybridomazellen

Milzzellen von Mäusen, die mit A/Eq/Miami/1/63 immunisiert worden waren, wurden nach Standardverfahren (Köhler und Milstein, 1975; Fazekas de St. Groth und Scheidegger, 1980) mit X63.Ag.8.653 Myelomzellen (Kearney et al., 1979) fusioniert.

Die fusionierten Zellen wurden dann zusammen mit frisch gewonnenen Peritonealmakrophagen in 24-Lochplatten (Fa. Flow, Meckenheim) bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre bebrütet.

Nach 10-12 Tagen, dies entsprach etwa einem 20-Zellen-Stadium, wurden erste antigenspezifische Tests (screening tests) durch-

geführt. Dazu wurden die Zellkultur-Überstände 1:5 und 1:10 in MEM verdünnt.

3.1.3.3. Isolierung antikörperproduzierender Kolonien

Positive Kolonien wurden möglichst rasch auf 24-Lochplatten isoliert, in die am Vortag Makrophagen in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml eingesät worden waren. Dieses "Picken" der Kolonien erfolgte mit Hilfe einer Pasteurpipette unter Sichtkontrolle durch das Mikroskop.

In das Loch, aus dem produzierende Kolonien gepickt wurden, wurde frisches Medium gegeben.

Weiter positiv bleibende und gut wachsende Kolonien wurden anschließend in 25 cm^2 -Zellkulturflaschen (Fa. Falcon, Heidelberg) und, nachdem diese entsprechend dicht gewachsen waren, in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen vermehrt, jeweils unter Zugabe von Peritonealmakrophagen als "feeder cells".

Bei Verdacht auf Kontamination der Kulturen durch Mykoplasmen wurden die Zellen mit Tiamulin (Tiamulintetrahydrofumarat, TAD GmbH, Cuxhaven) in einer Konzentration von 10 µg/ml behandelt.

3.1.3.4. Klonierung

War eine 75 cm^2 -Zellkulturflasche einer positiven Kolonie zu 80% dicht gewachsen, und wiesen die Zellen keine morphologisch sichtbaren Degenerationerscheinungen auf, so wurden die Kolonien nach der limiting-dilution-Technik in Mikroplatten kloniert. Dabei wurde, wie von Tappert (1981) und Hübert (1985) beschrieben, vorgegangen.

Die Mikroplatten wurden eine Woche bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Zellkulturüberstand von Näpfen, in denen nur eine einzige Kolonie gewachsen war, wurde dann auf die Bildung spezifischer Antikörper hin untersucht. Die positiven Klone wurden wiederum in 24-Lochplatten mit Makrophagen als "feeder cells" und anschließend in Zellkulturflaschen vermehrt.

Die Vermehrung in den 25 , 75 und 175 cm^2 -Zellkulturflaschen geschah ohne Zugabe von Makrophagen, da neben der Produktion spe-

zifischer Antikörper gutes Wachstum als weiteres Selektionskriterium galt.

Die nicht klonierten Zellen der 75 cm²-Zellkulturflasche wurden als Reserve nach Standardverfahren (Mayr et al., 1974) eingefroren.

3.1.3.5. Produktion von Asciten

Um möglichst große Mengen an monoklonalen Antikörpern zu erhalten, versucht man eine möglichst große Zellzahl zu erreichen. Da in einer Zellkultur stoffwechselbedingt nur eine bestimmte Zellzahl leben und produzieren kann, ist die Antikörperkonzentration begrenzt. Eine Konzentrationssteigerung um den Faktor 10² bis 10³ erreicht man, wenn man eine entsprechende Zellzahl in die Bauchhöhle einer Maus injiziert, um Ascites zu produzieren (Pollock et al., 1984).

Zur Ascites-Produktion wurden BALB/c-Mäuse verwendet, denen man 1 ml Pristane (2,6,10,14-Tetramethyl-Pentadecan, Fa. Aldrich, Steinheim) intraperitoneal verabreicht hatte. Etwa 10 Tage bis 6 Wochen später injizierte man jeder Maus ca. 10⁷ Zellen intraperitoneal. Nach 5 bis 6 Tagen zeigten die Mäuse deutliche Umfangsvermehrungen. Nach 8 bis 10 Tagen wurde unter sterilen Kantelen nach der Methode von Brodeur et al. (1984) Ascites gewonnen. Durchschnittlich wurde noch zwei- bis dreimal im Abstand von 2 bis 3 Tagen punktiert.

Die Ascitesflüssigkeit wurde nun bei 2000 g für 30 Min. zentrifugiert, über Nacht bei -20°C aufbewahrt, am folgenden Tag erneut zentrifugiert, in Aliquots von 2 ml portioniert und bei -20°C gelagert.

Diese Methode der i.p.-Injektion von Zellen wurde auch verwendet, um unsteril gewordene Zellkulturen nicht zu verlieren: die meist aus 175 cm²-Zellkulturflaschen stammenden Zellen wurden zweimal in MEM + 20% FKS "gewaschen" (Suspendierung und Zentrifugation bei 500 g für 10 Min.), in nach demselben Muster vorbehandelte Pristane-Mäuse injiziert und unter sterilen Kantelen 8 bis 10 Tage später mittels Punktion gewonnen. Anschließend wurde der Ascites bei 500 g 8 Min. zentrifugiert, der antikörperhaltige Über-

stand sorgfältig abpipettiert und das Sediment in Bezug auf die gewonnene Ascitesmenge 1:5 verdünnt. Ca. 3,0 ml der Zellsuspension wurde in 175 cm²-Flaschen mit 30 ml MEM + 20% FKS eingesät. 24 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden eingefroren.

3.1.4. Reinigung monoklonaler Antikörper

Die Ergebnisse von Hämagglutinations-Inhibitionstests können durch unspezifische Inhibitoren beeinträchtigt werden (Palmer et al., 1975). Inwieweit dies auch für Neuraminidase-Inhibitionstests gilt, ist nicht bekannt. Um etwaige unspezifische Faktoren auszuschalten, wurden deshalb Ascites-Portionen sämtlicher Klone zum einen bei 56°C für 30 Min. inaktiviert, zum anderen erfuhren Ascites-Aliquots aller Klone eine RDE-Behandlung. Weiterhin wurden Ascites-Portionen Protein-A-gereinigt und die so gewonnenen Eluate nochmals RDE-behandelt.

3.1.4.1. Protein-A-Affinitätschromatographie

Material:

Protein-A-Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Freiburg)

Waschpuffer A 0,05 M Tris-HCl pH 8,5

0,15 M NaCl

0,002% Thimerosal (Fa. Sigma, München)

Elutionspuffer B

0,1 M Glycin-HCl pH 3,0

Protein-A-Sepharose, die man in Waschpuffer (2,5g/5 ml) 10 Min. quellen ließ, wurde in eine 5 ml-Säule gefüllt und mit dem sechsfachen Säulenvolumen mit Waschpuffer äquilibriert. 1-2 ml Ascitesflüssigkeit wurde mit 0,1-0,2 ml 10fach konzentriertem Puffer A gemischt und auf die Säule mit einer Flußrate von ca. 0,5 ml/Min. aufgetragen.

Auffallend trübe Proben wurden zunächst mitteltourig (ca. 10000 g) abzentrifugiert und der Überstand zur Reinigung verwendet.

Die Protein-A-Säule wurde mit ca. 6 Volumina Puffer A gewaschen, bis alles nicht gebundene Material passiert hatte.

Nun wurde mit dem Puffer B eluiert, die jeweilige Antikörperfraktion wurde gesammelt, mit ca. 0,5 bis 1,0 ml 10fach Protein-A-Puffer auf pH 7,4 eingestellt und in Aliquots von 1 ml bei -20°C eingefroren.

Um die Reinheit der Protein-A-gereinigten Asciten zu überprüfen, wurden die Proteine der monoklonalen Antikörper in der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) nach Lämmli (1970) aufgetrennt. Der Proteingehalt der Eluate wurde nach Lowry et al. (1951) ermittelt.

3.1.5. RDE-Behandlung

Material:

Receptor-destroying enzyme (RDE; V. Cholerae, Strain 4Z, WHO Coll. Center Atlanta, Georgia, USA)

Natriumcitrat 2,5%ig (w/v) in A.dest. steril filtriert
PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + Natriumazid 0,5%ig (w/v) steril filtriert

Natriumchlorid 0,9%ig (w/v) in A.dest. steril filtriert
Calcium-Saline-Lsg. (1,0 g $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ + 9,0 g NaCl + 1,203 g H_3BO_4 + 0,052 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)

"RDE" ist ein Filtrat aus *Vibrio cholerae*, welches eine Reihe proteolytischer Enzyme aufweist und unspezifische Inhibitoren im Serum zerstört. Die RDE-Behandlung von Seren im Rahmen der Influenzadiagnostik ist dringend angeraten.

0,1 ml Ascites wurde mit 0,4 ml RDE (1:20 verdünnt in Ca-Saline) vermischt und für 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,3 ml Natriumcitrat 2,5%ig und 0,2 ml PBS + Natriumazid 0,5%ig dazugegeben. Diese Lösung wurde dann bei 56°C im Wasserbad 30 Min. inaktiviert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.1.6. Nachweis der Spezifität monoklonaler Antikörper

Die serologischen Tests, mit Hilfe derer der Nachweis spezifischer Antikörper geführt wurde, waren der Hämagglutinations-Inhibitionstest (HI), der Neuraminidase (NA) bzw. Neuraminidase-Inhibitionstest (NI) sowie ein Neutralisationstest im Ei.

3.1.6.1. Hämagglutinations-Inhibitionstest

Binden an das Hämagglutinin von Influenza-Virus spezifisch "hemmende" Antikörper, so verliert das Virus die Fähigkeit zur Agglutination, die Erythrozyten sinken ab und bilden am Boden der Testplatte einen roten Knopf.

Der HI-Test wurde nach Standardverfahren in Mikrotiterplatten (Palmer et al., 1975) mit vier bis acht HA-Einheiten und 0,5% Hühnererythrozyten (in NaCl-PP) durchgeführt, pro Stamm zwei Reihen. Nach 45-minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur erfolgte die Ablesung. Als positive Reaktion wurden nur Knöpfe angesehen, die bei schrägehaltener Platte Fließbewegung zeigten. Bei Diskrepanz zählte der niedrigere Wert.

Als Kontrolle dienten spezifische Frettsenseren (WF = WHO Ferret-Antiserum) bzw. ein Anti-H3-Ziegenserum (Nat. Inst. Allergy Inf. Dis., Bethesda, Maryland, USA).

3.1.6.2. Mikro-Neuraminidase-Test

Im Mikro-Neuraminidase-Test wird die Neuraminidase-Aktivität von Influenza-Viren ermittelt. Nach Aymard-Henry et al. (1973) basiert der Test auf folgenden Reaktionen: (a) Das Oberflächenenzym Neuraminidase spaltet von Fetuin freie N-acetyl-Neuraminsäure (NANA) ab. (b) Die freie NANA wird nun mittels Perjodat-Oxidation in β -formyl-Brenztraubensäure umgewandelt. (c) Durch Zugabe von Arsenit und Thiobarbitursäure kommt es beim Erhitzen in 56°C-heißem Wasserbad zu einer deutlichen Rosafärbung. Diese Färbung unterbleibt, wenn die Neuraminidase durch spezifische Antikörper blockiert wird, die Reagenzien bleiben dann bei Testende deutlich hell.

Dieser Inhibitionstest arbeitet ähnlich dem HI-Test mit seinen 4-8 hämagglutinierenden Einheiten (HE) mit Virus von ganz bestimmter Neuraminidase-Aktivität. Auf diese Aktivität wird das Virus entsprechend dem Ergebnis des Neuraminidase-Tests eingestellt. Der Test wurde durchgeführt in Anlehnung an Van Deusen et al. (1983), modifiziert nach Bachmann und Ottis (unveröffentlicht).

Material:

Fetuin (Fa. Sigma, München)

Natriummetaperjodat (Fa. Merck, Darmstadt)

Natriummetaarsenit (Fa. Merck, " ")

2-Thiobarbitursäure (Fa. Merck, " ")

Natriumazid reinst (Fa. Merck, " ")

Bovines Serumalbumin (BSA) (Fa. Serva, Heidelberg)

PBS ohne Ca- und Mg-Ionen

H₂SO₄ Konz.

H₃PO₄ Konz.

Na₂HPO₄ · 2H₂O (Fetuinpuffer)

KH₂PO₄ (")

Titertek Mikroschaker (Fa. Flow, Meckenheim)

Vor Testbeginn mußte der Gesamteiweißgehalt des Fetuins mittels der Mikro-Lowry-Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951) ermittelt werden.

Zur Herstellung von Fetuinpuffer wurde Lösung A (71 g Na₂KPO₄ x 2H₂O in 1000 ml A.dest.) mit Lösung B (60,5 g KH₂PO₄ in 1000 ml A.dest.) im Verhältnis 1:4 gemischt (pH 6,0), steril filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

Entsprechend dem beim Lowry-Assay erhaltenen Wert wurde die Fetuin-Stammlösung auf eine Konzentration von 25 mg Gesamteiweiß pro Milliliter Fetuinpuffer eingestellt, wobei der Gesamtgehalt des Fetuins an Neuraminsäure durchschnittlich 6,7% betrug (v. Hersteller angegeben). Diese Stammlösung wurde bei -20°C gelagert, die Gebrauchslösung erhielt man durch 1:10-Verdünnung der Stammlösung.

In 1000 ml PBS (pH 7,4) ohne Ca/Mg wurden 4 g BSA und 1 g Natriumazid gelöst, steril filtriert und in Aliquots von 100 ml bei -20°C gelagert.

4,28 g Natriummetaperjodat wurden in 38 ml A.dest. gelöst, mit 62 ml konzentrierter Orthophosphorsäure vermischt und in braunen Flaschen bei Zimmertemperatur gelagert.

50 g Natriummetaarsenit wurden in 100 ml A.dest. gelöst und nach Zugabe von 1,5 ml konz. H₂SO₄ bei Raumtemperatur aufbewahrt.

0,6 g 2-Thiobarbitursäure wurden in 100 ml A.dest. gelöst, kurz bei 56°C im Wasserbad erhitzt und nach Abkühlung im Kühlschrank

bei Zimmertemperatur gelagert. Arsenit- und Thiobarbitursäure-Lösungen wurden immer frisch angesetzt.

Die Tests wurden in Mikrotiterplatten (Rundboden, Fa. Greiner) folgendermaßen durchgeführt:

- (a) Pro Loch wurden 25 µl PBS + 0,4% BSA + 0,1% Natriumazid vorgelegt.
- (b) In die Löcher der ersten Reihe wurden 25 µl unverdünntes Virus gegeben, pro Stamm drei Reihen, und mit 25 µl-Dilutern verdünnt.
- (c) Nun wurden in jedes Loch 25 µl der Fetuinlösung getropft. Nachdem die Platte auf dem Schüttler 15 Sekunden geschüttelt worden war, wurde sie mit Folie zugeklebt und 3 h bei 37°C bebrütet.
- (d) Anschließend wurden 25 µl Perjodat-Lösung pro Loch zugegeben, 15 Sekunden geschüttelt und bei Zimmertemperatur inkubiert.
- (e) Nach exakt 20 Min. wurden 25 µl Arsenit-Lösung pro Loch während des Schüttelns auf die Platte getropft. Die Platten wurden so lange auf dem Mikroshaker geschüttelt, bis die Braunfärbung, die nach Zugabe des Arsenits auftritt, wieder verschwand. Der Inhalt der Näpfe wies nun weiß-gelbliche Farbe auf.
- (f) Nun erfolgte die Zugabe von 100 µl Thiobarbitursäure-Lösung pro Loch. Nach kurzem Schütteln wurden die Platten wieder zugeklebt und über jedem Loch die Folie mit einer Kanüle fein punktiert, um den bei der Reaktion entstehenden Gasen den Austritt zu ermöglichen.
- (g) Direkt anschließend wurden die Platten im Wasserbad bei 56°C für 30 Min. erhitzt. Zur Ablesung der Titration wurden die Klebefolien abgezogen und bei Aufsicht unter weißem Untergrund die höchste Verdünnungsstufe ermittelt, bei der noch eine intensive Rotfärbung zu erkennen war. Abhängig vom Ergebnis wurde das Virus für den NI-Test eingestellt: bei einem NA-Titer von 1:16 wurde der Stamm in PBS ohne Ca/Mg + 0,4% BSA + 0,1% Natriumazid 1:16 verdünnt.

Als Kontrolle lief eine Leer-Kontrolle mit, welche alle Substanzen exklusive Virus enthielt.

3.1.6.3. Mikro-Neuraminidase-Inhibitionstest

- (a) Pro Loch wurden wiederum 25 μ l PBS + BSA + Natriumazid vorgelegt.
- (b) In die erste Zeile wurde 25 μ l Antikörper-Lösung gegeben, pro Klon drei Reihen und mit 25er Dilutern verdünnt.
- (c) Nun erfolgte die Zugabe von 25 μ l vorverdünntem Virus pro Loch. Nachdem für 20 Sekunden geschüttelt worden war, wurde für 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Um eventuelle Austrocknung zu verhindern, wurden die Platten zugeklebt. Das weitere Vorgehen entsprach dem Neuraminidase-Test ab Punkt (c).

Die Ablesung erfolgte mit bloßem Auge: keine Hemmung der Neuraminidase = deutlich rosa. Hemmung der Neuraminidase = deutlich verminderte Farbgebung (weiß).

Als Viruskontrolle dienten zwei Reihen mit Virus in der Gebrauchsverdünnung. Zusätzlich erfolgte in zwei Reihen eine Rücktitrierung der Neuraminidase-Aktivität.

Als Negativ-Kontrollen liefen ein Negativ-Ascites und ein im HI-Test positiver Ascites mit, desweiteren wieder eine Leer-Kontrolle.

Zur Beurteilung der höchsten Hemmstufe diente als Positiv-Kontrolle Anti-N8 (Anti-Neg 2) Typisierungsserum (Ziege, Nat. Inst. Allerg. Inf. Dis., Bethesda, Maryland, USA), 1:10 verdünnt in PBS + BSA + Natriumazid, welches parallel mit den Antikörpern verdünnt wurde.

3.1.6.4. Neutralisationstest

Die hämagglutinationshemmenden MAK 7/12 und 8/4 sowie die Anti-Neuraminidase-MAK 1/3 und 4/3 wurden auf neutralisierende Aktivität hin überprüft.

Hierfür wurden die Protein-A-gereinigten Asciten 1:50 in sterilem PBS verdünnt. A/Eq/Miami/1/63-Virus (HA-Titer 1:128) wurde in der Verdünnung 10^{-4} , 10^{-6} und 10^{-8} 1:1 mit einem vorverdünnten MAK gemischt und 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden je 0,2 ml dieser Suspension in 10-tägige be-

brütete Hühnereier verimpft, pro Verdünnungsstufe drei Eier. Als Kontrolle wurde die Virussuspension in den jeweiligen Verdünnungen mit PBS versetzt und auf Eier verimpft. Nach 3-tägiger Bebrütung bei 37°C wurde die Allantoisflüssigkeit geerntet und ein HA-Test durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Herstellung monoklonaler Antikörper

Es wurden insgesamt 10 Fusionen durchgeführt, die sehr unterschiedliche Erfolge zeigten. Bei neun Fusionen war entweder kein Wachstum von Hybridomazellen zu beobachten oder nur Wachstum von Hybridomazellen, die keine spezifischen Antikörper produzierten. Bei einer Fusion waren von 192 getesteten Näpfen von acht Linbro-Platten (die Zellkulturüberstände wurden für den HI- und NI-Test 1:10 verdünnt) 13 im HI-Test und einer im NI-Test positiv. In diesen 14 Löchern befanden sich insgesamt 31 Kolonien.

Die einzelnen Kolonien wurden unter dem Mikroskop auf 24-Lochplatten gepickt, in denen sich Makrophagen als feeder cells befanden. Vier Tage später wurden sie nochmals getestet und dann auf 25 cm²-Flaschen vermehrt. Hierbei stellte sich heraus, daß von den 31 Kolonien nur noch bei 16 Kolonien eine spezifische Antikörperproduktion nachweisbar war. Diese Kolonien wurden auf 75 cm²-Flaschen vermehrt und nach ca. 4 Tagen erneut einem HI- und einem NI-Test unterzogen. Die HI-positiven Kolonien wiesen Titer von 1:10 auf, die NI-positiven solche von 1:64.

Auf Grund der Resultate dieses Tests mußte festgestellt werden, daß von den 16 Kolonien zehn aufgehört hatten, Antikörper zu produzieren. Der Verlust der Produktion ging bei diesen Zellen nur zu einem geringen Teil mit morphologischen Degenerationen einher. Das Absterben dieser Hybridomazellen konnte weder durch Veränderung der Makrophagen-Konzentration noch durch Änderung des Medienvolumens noch durch Thiamulinbehandlung bei Verdacht auf Kontamination durch Mykoplasmen verhindert werden. Aus den verbliebenen drei HI- und drei NI-positiven Kolonien wurden letztendlich durch limiting-dilution-Technik die dieser Arbeit zugrundeliegenden Klone isoliert.

In der Bezeichnung dieser Klone steht die erste Zahl für die Kolonie, von der der Klon stammt. Die Zahl hinter dem Schräg-

strich bezeichnet den einzelnen Klon. Hierbei konnte beobachtet werden, daß diejenigen Zellklone, die Antineuraminidase-Antikörper mit Titern von 1:64 bis 1:128 produzierten, sich deutlich besser vermehren ließen als die im HI-Test positiven Klone, deren Titer sich in Zellkulturflaschen nicht über 1:10 steigern ließen.

Die klonierten Hybridomazellen wurden vermehrt und in flüssigem Stickstoff konserviert. Zur Herstellung von hochtitrigen Antikörpern wurden ca. 10^7 Zellen i.p. in BALB/c-Mäuse injiziert, die zuvor mit Pristane behandelt worden waren. Nach 10-12 Tagen wurden pro Maus 7-10 ml Ascitesflüssigkeit gewonnen, die nach Reinigung bei -20°C gelagert wurde.

4.2. Überprüfung der Spezifität hämagglutinationshemmender MAK

Um die Spezifität der HI-positiven Klone für das Hämagglutinin des Subtyps 3 zu überprüfen, wurden die für 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad inaktivierten Asciten der Klone 3/1, 3/3, 3/5, 7/12 und 8/4 gegen weitere Subtypen im HI-Test untersucht: A/Duck/Bavaria/2/77 (H1N1); A/Duck/Czechoslow/1/56 (H4N6); A/Tern/South Africa/61 (H5N3); A/Turkey/Massach /65 (H6N2); A/Turkey/Oregon/71 (H7N3); A/Turkey/Ontario/6118/67 (H8N4); A/Turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2); A/Quail/Italy/1117/65 (H10N8); A/Duck/England/56 (H11N6).

Eindeutig wurde keiner der Stämme von den Klonen erkannt. Daraufhin wurden dieselben Klone gegen den Influenza A/Equi-1-Subtyp, A/Eq/Prague/1/56 (H7N7), getestet. Auch hierbei war in der HI-Reaktion eindeutig keine Hemmung feststellbar.

Nun wurden die Klone gegen einen gleich typisierten Stamm einer anderen Spezies, A/Duck/Ukraine/1/63 (H3N8), im HI-Test getestet. Dabei wurden die in Tabelle 1 zusammengefaßten Ergebnisse erzielt.

MAK Antigene	3/1	3/3	3/5	7/12	8/4	Antiserum
A/Duck/ Ukraine/1/63	1:128	1:64	1:32	<1:2	1:64	1:64 (Anti-H3 Ziege)
A/Eq/ Miami/1/63	1:1280	1:1280	1:320	1:320	1:1280	1:320 (WF47)

Tabelle 1: Klone 3/1, 3/3, 3/5, 7/12, 8/4 (Asciten, unbehandelt) gegen A/Dk/Ukraine/1/63 (H3N8) und A/Eq/Miami/1/63

4.2.1. Vergleichende Untersuchungen von Influenza A/Equi-2-Stämmen mit MAK gegen das Hämagglutinin von A/Eq/Miami/1/63

Es wurden 17 H3N8-Isolate aus Nord- und Südamerika, Nordafrika, Japan, West-, Süd- und Osteuropa verglichen, die zwischen 1963 und 1983 isoliert worden waren. Die Stämme wurden auf 10-11 Tage alten bebrüteten Hühnereiern vermehrt, nach dem unter Punkt 3.1.1. genannten Verfahren gereinigt und bei -70°C gelagert. Als Kontrollseren dienten homologe Frettchenseren bzw. Ziegenseren zur Typisierung von H3 (WHO Center Atlanta, GA, USA).

4.2.1.1. Vergleichende Untersuchungen mit hitzeinaktivierten Asciten

Zunächst wurden die fünf monoklonalen Antikörper als inaktivierter Ascites (30 Min., 56°C) auf ihre Spezifität gegen 17 equine Influenzastämme überprüft. Die homologen Titer gegen A/Eq/Miami/1/63 betrugen 1:320 und 1:1280, der Hemmtiter des homologen Frettchenserums lag ebenfalls bei 1:320.

Vergleichbare Ergebnisse wurden bei den Klonen 3/1, 3/3, 3/5 und 8/4 bei 13 weiteren H3N8-Stämmen erzielt.

Der Stamm A/Eq/Algier/1/72 wurde vom MAK 8/4 ebenfalls mit einem Titer 1:320 gehemmt, von den anderen MAK aber wesentlich geringer.

Der Stamm A/Eq/France/67 wurde noch weniger gehemmt, der Stamm A/Eq/Sachyama/71 bei einer Verdünnung der MAK von 1:20 überhaupt nicht.

Das Reaktionsspektrum des MAK 7/12 stellte sich ganz anders dar: eine homologe Hemmreaktion war bis zu einer Verdünnung von 1:320 nachweisbar, ebenso beim Stamm A/Eq/Milano/2/63.

Der Stamm A/Eq/Switz/2225/79 wurde bis zu einer MAK-Verdünnung von 1:1280 gehemmt, das Isolat A/Eq/Detroit/3 bis zu einer Verdünnung von 1:40.

Alle anderen Stämme wurden dagegen bei einer Verdünnung von 1:20 nicht gehemmt.

Die genauen Titer faßt Tabelle 2 zusammen.

4.2.1.2. Vergleichende Untersuchungen mit RDE-behandelten Asciten

Seren, die auf Antikörper gegen Influenzaviren untersucht werden sollen, werden mit RDE behandelt, um unspezifische Reaktionen zu eliminieren, d.h. nicht behandelte Seren besitzen höhere Hemmtiter als RDE-behandelte.

Dieses Verhalten konnte bei den RDE-behandelten Asciten nur bei den Stämmen beobachtet werden, die zuvor von nicht RDE-behandelten Asciten nur schwach gehemmt worden waren.

Die Isolate A/Eq/Algier/1/72, A/Eq/Sachyama/71 und A/Eq/France/67 wurden von keinem der behandelten Asciten mehr gehemmt.

Bei den anderen Stämmen, die von den MAK 3/1, 3/3, 3/5 und 8/4 gut gehemmt worden waren, führte die RDE-Behandlung zu keiner Verringerung der Aktivität, vielmehr ließen sich um ein bis zwei Titerstufen höher ausfallende HI-Reaktionen festhalten.

Veranschaulicht wird dies durch Abbildung 3 am Beispiel des MAK 8/4.

Die gegen das H3 gerichtete Aktivität des MAK 7/12 wurde dagegen durch Behandlung mit RDE nicht beeinflusst.

Einen Überblick über alle Reaktionen vermittelt Tabelle 3.

Antigene \ MAK	3/1	3/3	3/5	7/12	8/4	WF	Anti H3
A/Eq/Miami/1/63	1280	1280	320	320	1280	320	
A/Eq/Detroit/63	1280	640	320	40	1280	160	
A/Eq/Uruguay/63	2560	1280	640	<20	1280		160
A/Eq/Milano/2/63	1280	2560	640	320	1280		640
A/Eq/France/67	40	40	20	<20	80		160
A/Eq/Sao Paulo/2/69	1280	2560	1280	<20	1280	160	
A/Eq/Sachyama/71	<20	<20	<20	<20	<20		320
A/Eq/Algier/1/72	80	80	<20	<20	320		320
A/Eq/California/1/76	1280	1280	640	<20	1280		160
A/Eq/Newmarket/10/76	2560	1280	640	<20	2560		160
A/Eq/Kaskadeur/78	2560	2560	640	<20	2560		80
A/Eq/Fontainebleu/79	1280	1280	640	<20	1280	160	
A/Eq/Solvalla/79	2560	2560	640	<20	2560	80	
A/Eq/Switz/2225/79	2560	2560	640	1280	1280		320
A/Eq/Romania/1/80	1280	1280	640	<20	1280		160
A/Eq/Kentucky/1/81	640	1280	640	<20	640	80	
A/Eq/Aby/83	1280	1280	640	<20	1280		320

Tabelle 2: Reaktionen im HI-Test von Influenza A/Equi-2-Stämmen (H3N8) mit MAK gegen das Hämagglutinin von A/Eq/Miami/1/63.

MAK: Ascites, 30 Min. bei 56°C inaktiviert.

Angegeben sind die reziproken Titerwerte.

Kontrollseren (Anti-H3-Ziegenserum und WHO-Frettschenserum) RDE-behandelt.

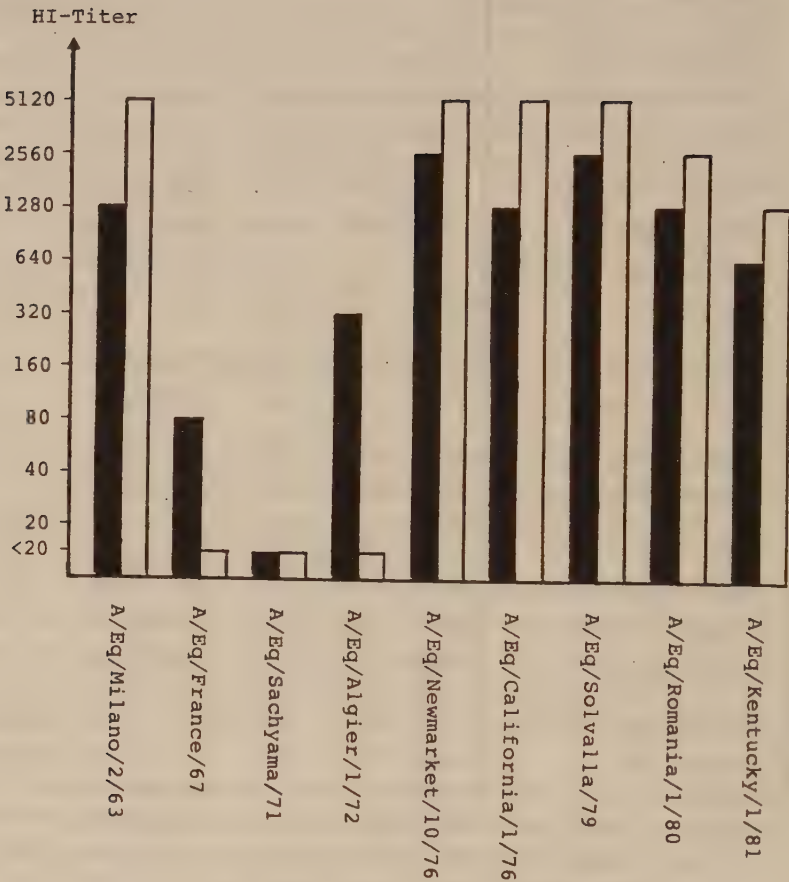


Abbildung 3: Reaktionen des MAK 8/4, inaktiviert (schwarz) und RDE-behandelt (weiß) mit verschiedenen Virusstämmen. Angegeben sind die reziproken Titerwerte.

Antigene \ MAK	3/1	3/3	3/5	7/12	8/4	WF	Anti H3
A/Eq/Miami/1/63	2560	2560	1280	160	1280	320	
A/Eq/Detroit/63	2560	1280	640	80	2560	160	
A/Eq/Uruguay/63	2560	2560	1280	<20	2560		160
A/Eq/Milano/2/63	2560	2560	1280	640	5120		640
A/Eq/France/67	<20	<20	<20	<20	<20		160
A/Eq/Sao Paulo/2/69	2560	1280	2560	<20	2560	160	
A/Eq/Sachyama/71	<20	<20	<20	<20	<20		320
A/Eq/Algier/1/72	<20	<20	<20	<20	<20		320
A/Eq/California/1/76	2560	2560	1280	<20	5120		160
A/Eq/Newmarket/10/76	5120	2560	1280	<20	5120		160
A/Eq/Kaskadeur/78	2560	2560	1280	<20	2560		80
A/Eq/Fontainebleu/79	2560	2560	1280	<20	1280	160	
A/Eq/Solvalla/79	2560	2560	1280	<20	5120	80	
A/Eq/Switz/2225/79	1280	1280	640	1280	1280		320
A/Eq/Romania/1/80	2560	2560	1280	<20	2560		160
A/Eq/Kentucky/1/81	1280	2560	1280	<20	1280	80	
A/Eq/Aby/83	2560	1280	1280	<20	2560		320

Tabelle 3: Reaktionen im HI-Test von Influenza A/Equi-2-Stämmen (H3N8) mit MAK gegen das Hämagglutinin von A/Eq/Miami/1/63.

MAK: Asciten, RDE-behandelt.

Angegeben sind die reziproken Titerwerte.

4.2.1.3. Vergleichende Untersuchungen mit Protein-A-gereinigten Asciten

Aus gelelektrophoretischen Untersuchungen von ungereinigten Asciten war bekannt, daß neben den Immunglobulinketten eine Vielzahl weiterer Proteinbestandteile im Ascites vorkommt. Deshalb versuchte man über Protein-A-Affinitätschromatographie eine Reinigung der Immunglobuline zu erhalten. Waren die inaktivierten Asciten der MAK in NaCl-PP 1:10 und die RDE-behandelten Asciten durch die für die RDE-Behandlung benötigten Substanzen 1:10 verdünnt worden, so wurde im Zuge der Protein-A-Reinigung der Ascites durch die Säulenpassage 1:10 in Elutionspuffer B verdünnt. Mit dem so gewonnenen Eluat wurden daraufhin die Isolate erneut einem HI-Test unterzogen.

Die Ergebnisse der HI-Tests sind nahezu identisch mit den Ergebnissen, die mit inaktivierten Asciten erzielt worden waren. Tabelle 4 faßt die Ergebnisse zusammen.

Beim MAK 3/5 konnte eine deutliche Steigerung der Titerwerte nach Protein-A-Reinigung verzeichnet werden: von 17 Stämmen wiesen 12 Stämme höhere Titer auf, 8 davon um zwei Stufen.

4.2.1.4. Vergleichende Untersuchungen mit Protein-A-gereinigten und RDE-behandelten Asciten

Durch Reinigung über Affinitätschromatographie mit Protein-A konnte elektrophoretisch reines IgG gewonnen werden. An diesen Präparationen wurde der Effekt einer RDE-Behandlung auf die HI-Reaktivität dieser MAK überprüft.

Durch die Säulenpassage wurde der Ascites 1:10 in Elutionspuffer verdünnt. Durch die anschließende RDE-Behandlung erfolgte nochmals eine 1:10-Verdünnung. Der für die Tests verwendete Ascites lag somit in einer Vorverdünnung von 1:100 vor. Die Testergebnisse werden in Tabelle 5 dokumentiert.

Ein Vergleich der Tabelle 4 mit der Tabelle 5 läßt aus Gründen der unterschiedlichen Vorverdünnungen lediglich tendenzielle Schlüsse zu:

Bei dem MAK 3/5 sanken in der H3-Reaktion nahezu alle Titer

Antigene \ MAK	3/1	3/3	3/5	7/12	8/4	WF	Anti H3
A/Eq/Miami/1/63	2560	1280	5120	160	2560	320	
A/Eq/Detroit/63	2560	1280	2560	160	2560	160	
A/Eq/Uruguay/63	2560	2560	1280	<20	5120		160
A/Eq/Milano/2/63	5120	1280	1280	160	5120		640
A/Eq/France/67	40	80	40	<20	40		160
A/Eq/Sao Paulo/2/69	2560	2560	5120	<20	2560	160	
A/Eq/Sachyama/71	<20	<20	<20	<20	<20		320
A/Eq/Algier/1/72	40	<20	40	<20	<20		320
A/Eq/California/1/76	2560	2560	2560	<20	2560		160
A/Eq/Newmarket/10/76	1280	1280	5120	<20	2560		160
A/Eq/Kaskadeur/78	640	1280	2560	<20	2560		80
A/Eq/Fontainebleu/79	1280	2560	1280	<20	2560	160	
A/Eq/Solvalla/79	2560	1280	5120	<20	5120	80	
A/Eq/Switz/2225/79	5120	2560	1280	640	2560		320
A/Eq/Romania/1/80	1280	640	1280	<20	2560		160
A/Eq/Kentucky/1/81	2560	1280	5120	<20	2560	80	
A/Eq/Aby/83	2560	5120	5120	<20	5120		320

Tabelle 4: Reaktionen im HI-Test von Influenza A/Equi-2-Stämmen (H3N8) mit MAK gegen das Hämagglutinin von A/Eq/Miami/1/63.

MAK: Asciten, Protein-A-gereinigt.

Angaben sind die reziproken Titerwerte.

Antigene \ MAK	3/1	3/3	3/5	7/12	8/4	WF	Anti H3
A/Eq/Miami/1/63	6400	1600	1600	200	6400	320	
A/Eq/Detroit/63	3200	800	1600	200	3200	320	
A/Eq/Uruguay/63	1600	800	1600	<200	1600		160
A/Eq/Milano/2/63	1600	800	1600	400	3200		320
A/Eq/France/67	<200	<200	<200	<200	<200		320
A/Eq/Sao Paulo/2/69	1600	800	800	<200	3200	80	
A/Eq/Sachyama/71	<200	<200	<200	<200	<200		320
A/Eq/Algier/1/72	<200	<200	<200	<200	<200		320
A/Eq/California/1/76	1600	800	1600	<200	3200		320
A/Eq/Newmarket/10/76	3200	1600	1600	<200	6400		320
A/Eq/Kaskadeur/78	3200	800	1600	<200	3200		160
A/Eq/Fontainebleu/79	1600	800	800	<200	1600	160	
A/Eq/Solvalla/79	3200	1600	1600	<200	3200	80	
A/Eq/Switz/2225/79	1600	800	800	800	1600		320
A/Eq/Romania/1/80	1600	800	800	<200	1600		160
A/Eq/Kentucky/1/81	1600	800	1600	<200	1600	80	
A/Eq/Aby/83	3200	800	800	<200	3200		320

Tabelle 5: Reaktionen im HI-Test von Influenza A/Equi-2-Stämmen (H3N8) mit MAK gegen das Hämagglutinin von A/Eq/Miami/1/63.

MAK: Asciten, Protein-A-gereinigt und RDE-behandelt.
 Angegeben sind die reziproken Titerwerte.

und pendelten sich bei Erkennen eines Stammes bei den Werten 1:800 bis 1:1600 ein. Dasselbe Ergebnis war auch bei dem MAK 3/3 zu verzeichnen.

Bei den MAK 3/1 und 8/4 konzentrierten sich ebenfalls die HI-Werte einheitlich im Bereich von 1:1600 bis 1:3200, wobei die Reaktionen mit A/Eq/Miami/1/63 und A/Eq/Newmarket/10/76 mit 1:6400 die beiden höchsten Werte markierten.

Der MAK 7/12 zeigte in seiner Reaktion mit den Stämmen angesichts des Verdünnungsfaktors keine vom unbehandelten Eluat abweichenden Ergebnisse.

Verglich man die Reaktionen der MAK auf die verschiedenen Reinigungsverfahren, so konnten bei dem MAK 3/5 am deutlichsten Einflüsse abgelesen werden. Ausgehend von der Inaktivierung bei 56°C brachten sowohl die RDE-Behandlung als auch die Protein-A-Reinigung fast durchwegs Titersteigerungen in der HI-Reaktion gegenüber den einzelnen Stämmen. Absinkende Titer ließen sich erst im 4. Schritt, der RDE-Behandlung des Protein-A-Eluats, registrieren, wobei aber in diesem Fall auch unterschiedliche Ausgangsverdünnungen benutzt werden mußten. Veranschaulicht wird dies durch Abbildung 4.

Durch diese Behandlungsverfahren konnte jedoch bei keinem der MAK die Sensibilität gegenüber A/Eq/Sachyama/71 gesteigert werden.

4.2.2. Untersuchungen von Tween-Äther-behandelten Influenza A/ Equi-2-Stämmen mit MAK gegen A/Eq/Miami/1/63

Um zu untersuchen, welchen Einfluß die Tween-Äther-Behandlung des Antigens auf die Reaktionen mit MAK im HI-Test ausüben kann, wurden die Protein-A-gereinigten MAK 3/3, 7/12 und 8/4 gegen sechs Tween-Äther-behandelte Stämme getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

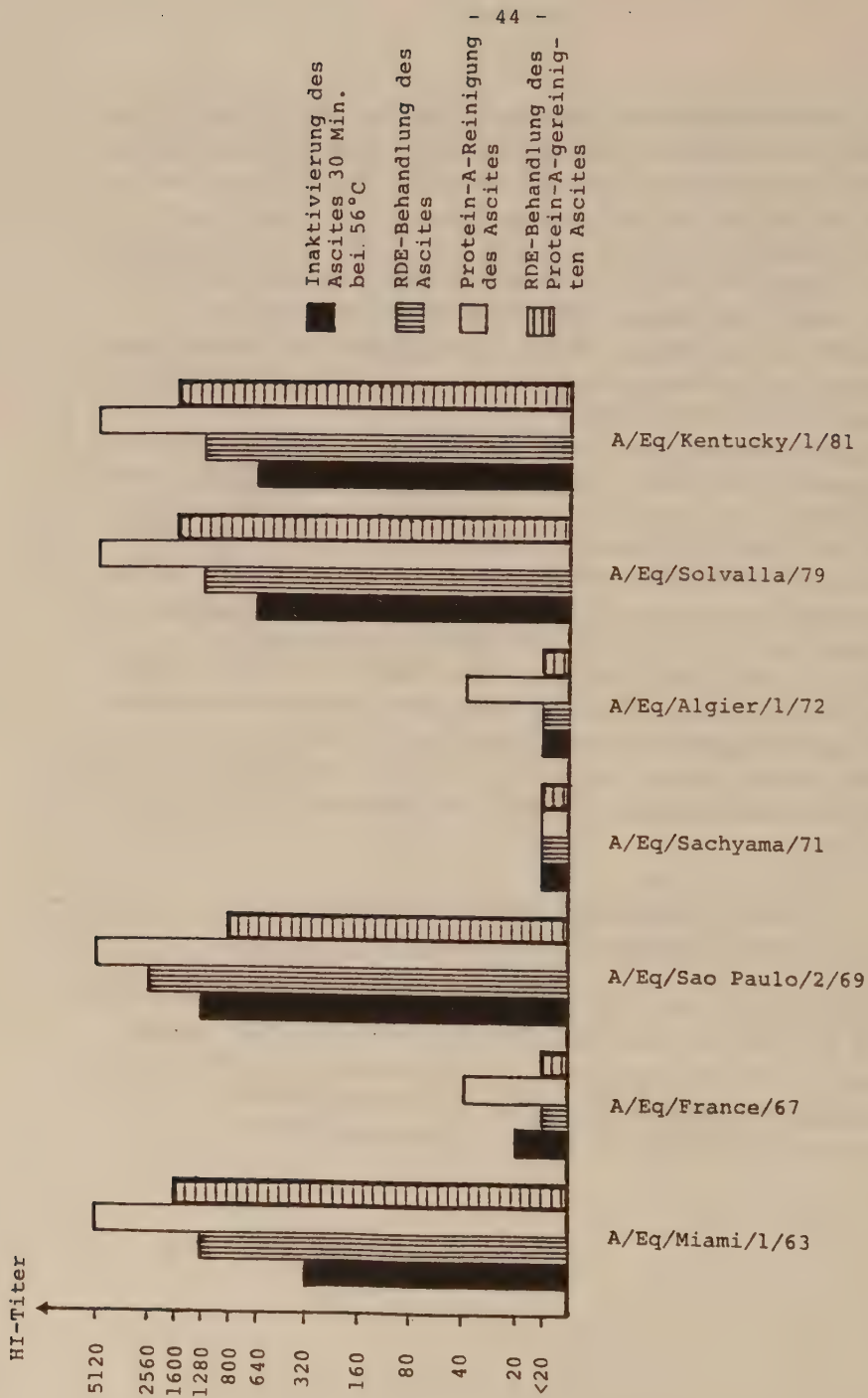


Abbildung 4: Vergleich der Wirkung der einzelnen Reinigungsverfahren auf den MAK 3/5 in seiner Reaktion mit verschiedenen Stämmen.

Angegeben sind die reziproken Miterwerte

Antigene \ MAK	TÄB		TÄB		TÄB		WF	TÄB WF
	7/12	7/12	8/4	8/4	3/3	3/3		
A/Eq/Miami/1/63	160	5120	2560	5120	1280	5120	320	2560
A/Eq/Kentucky/1/81	<20	<20	2560	2560	1280	2560	160	320
A/Eq/France/67	<20	<20	40	40	80	80	320	1280
A/Eq/Detroit/63	40	320	2560	2560	1280	2560	160	320
A/Eq/Sachyama/71	<20	<20	<20	<20	<20	<20	640	1280
A/Eq/Switz/2225/79	640	2560	2560	2560	2560	2560	320	1280

Tabelle 6: Vergleich der Reaktionen von MAK mit Tween-Äther-behandelten und nicht behandelten Stämmen.
 Angegeben sind die reziproken Titerwerte.
 TÄB: Tween-Äther-Behandlung

Gegen den homologen Stamm A/Eq/Miami/1/63 reagierten alle MAK höher, besonders deutlich der MAK 3/3 mit einem zweifach und der MAK 7/12 mit einem fünffach höheren Titer. Das Kontrollserum wies ebenfalls eine Titersteigerung um drei Stufen auf. Bei A/Eq/France/67 und A/Eq/Sachyama/71 ließ sich keine Erhöhung der Titer verzeichnen, bei A/Eq/Kentucky/1/81 war es lediglich der MAK 3/3, der eine Stufe höher reagierte.

Deutliche Steigerung des HI-Titers wies wiederum der MAK 7/12 im Falle von A/Eq/Detroit/63 (dreifach) und A/Eq/Switz/2225/79 (zweifach) auf, wobei ersterer Stamm auch von 3/3 eine Stufe höher gehemmt wurde.

Der Stamm A/Eq/Sachyama/71 wurde auch nach Tween-Äther-Behandlung von keinem der MAK gehemmt.

4.3. Überprüfung der Spezifität Neuraminidase-hemmender MAK

Es wurden 11 Anti-Neuraminidase-MAK isoliert. Die Klone 1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 2/1, 2/2, 2/3, 2/4, 4/2, 4/3 und 4/5 wurden in je drei BALB/c-Mäuse injiziert und der gewonnene Ascites denselben vier Behandlungsverfahren ausgesetzt wie die hämagglutinationshemmenden MAK.

Um die Klone auf ihre Eignung als spezifisch N8(N8eq2)-hemmende Antikörper zu überprüfen, wurden sie gegen das N7 des Equi-1-Referenzstammes A/Eq/Prague/1/56 im NI-Test getestet. Als Positiv-Kontrolle diente Ziegen-Anti-N7 (Anti-Neql, Bethesda, Maryland, USA), als Negativ-Kontrolle ein Negativ-Ascites, der durch i.p.-Applikation von Myelomzellen in BALB/c-Mäuse hergestellt worden war.

Da bekannt ist, daß falsch-positive Resultate in Anwesenheit hochpotenter Anti-HA Antikörper entstehen können, lief als weitere Negativ-Kontrolle unbehandelter Ascites des MAK 3/5 mit.

Bei allen MAK verlief die NI-Reaktion mit A/Eq/Prague/1/56 eindeutig negativ.

4.3.1. Vergleichende Untersuchungen von Influenza A/Equi-2-Stämmen mit MAK gegen die Neuraminidase von A/Eq/Miami/1/63

Auch bei der Untersuchung dieses zweiten Oberflächenantigens galt es herauszufinden, a) welche Variation weist dieses Enzym innerhalb der zu untersuchenden Isolate auf, und b) inwieweit ist die Reaktion der MAK durch oben genannte Reinigungsverfahren beeinflussbar.

4.3.1.1. Vergleichende Untersuchungen mit inaktivierten Asciten

Die Asciten wurden 30 Min. bei 56°C im Wasserbad inaktiviert und 1:1000 in PBS ohne Ca/Mg mit 0,4% BSA und 0,1% Natriumazid verdünnt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Die Neuraminidasen von A/Eq/Sachyama/71 und A/Eq/Kentucky/1/81 wurden bei der für den Test gewählten Verdünnung von keinem der 11 MAK erkannt ($<1:2000$), reagierten jedoch mit Ziegen-Anti-N8 mit einem Titer von 1:640.

Verglich man die Reaktionen der MAK 1/1 bis 1/4 mit den Isolaten, so konnte festgehalten werden, daß sich die Reaktionen der Stämme im Bereich von $\pm$ zwei Titerstufen verglichen mit A/Eq/Miami/1/63 einordnen ließen. Die höchsten Werte bei diesen MAK markierten A/Eq/Solvalla/79 und A/Eq/Sao Paulo/2/69 mit 1:128000.

Weiterhin fiel auf, daß A/Eq/Milano/2/63 von den MAK der Gruppe 1, 2 und 4 einheitlich mit einem Titer von 1:64000 gehemmt wurde. Gleiches galt für A/Eq/California/1/76, wo - exklusive 1/1 - alle Klone einheitlich mit 1:32000 reagierten. Diesem Reaktionsmuster von lediglich einer Titerstufe Unterschied stand die Reaktion mit Anti-N8 entgegen: bei A/Eq/Milano/2/63 1:320, bei A/Eq/California/1/76 1:2560.

Fast identische Werte wie bei diesen beiden Stämmen wies A/Eq/Aby/83 auf. Angesichts der Reaktionstendenz der übrigen MAK darf der Reaktion von 2/1 keine zu große Bedeutung beigemessen werden.

Die Ergebnisse der Klone 4/2, 4/3 und 4/5 ermöglichten eine eindeutige Zuordnung von A/Eq/Kaskadeur/78 und A/Eq/Romania/1/80 zu A/Eq/Miami/1/63: alle drei wiesen identische Titer und ähnliche Reaktion mit Anti-N8 auf.

A/Eq/Aby/83 und A/Eq/Milano/2/63 wiesen mit ihren Reaktionstitern mit dem MAK 4/2 von 1:64000 den weitesten Abstand zu A/Eq/Miami/1/63 auf.

Antigene	MAK	1/1	1/2	1/3	1/4	2/1	2/2	2/3	2/4	4/2	4/3	4/5	Anti N8
A/Eq/Miami/1/63		32	16	16	16	16	16	16	16	8	16	16	640
A/Eq/Detroit/63		32	32	16	16	16	16	32	32	16	32	32	1280
A/Eq/Uruguay/63		32	32	16	16	64	64	64	32	16	16	32	640
A/Eq/Milano/2/63		64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	320
A/Eq/France/67		32	16	16	32	32	16	64	64	16	32	32	320
A/Eq/Sao Paulo/2/69		128	32	32	64	64	64	64	64	32	128	64	1280
A/Eq/Sachyama/71		<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	640
A/Eq/Algier/1/72		32	32	16	32	64	32	32	32	32	64	64	640
A/Eq/California/1/76		16	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	2560
A/Eq/Newmarket/10/76		16	32	32	32	32	32	32	64	32	64	64	1280
A/Eq/Kaskadeur/78		16	16	8	16	32	16	16	32	8	16	16	1280
A/Eq/Fontainebleu/79		16	16	16	32	16	16	32	32	16	32	16	1280
A/Eq/Solvalla/79		128	32	32	128	32	32	32	64	32	64	64	1280
A/Eq/Switz/2225/79		16	32	16	16	16	16	32	32	32	32	64	640
A/Eq/Romania/1/80		32	32	16	32	32	16	16	32	8	16	16	640
A/Eq/Kentucky/1/81		<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	640
A/Eq/Aby/83		64	64	32	64	256	64	64	64	64	32	64	1280

Tabelle 7: Reaktionen im NI-Test von Influenza A/Equi-2-Stämmen (H3N8) mit MAK gegen die Neuraminidase von A/Eq/Miami/1/63.

MAK: Asciten, 30 Min. bei 56°C inaktiviert, 1:1000 in PBS + BSA + Na-azid.

Angegeben sind die reziproken Titerwerte (Titerwerte der MAK x 1000)

4.3.1.2. Vergleichende Untersuchungen mit RDE-behandelten Asciten

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse mit RDE-behandelten Asciten liegt in Form der Tabelle 8 vor. Die Resultate wichen von denen der Tests mit inaktivierten Asciten nicht wesentlich ab. Titeranstiege bzw. -senkungen bewegten sich im Bereich von $\pm$ zwei Titerstufen. Ein überwiegend positiver, die Titer steigernder Effekt wie bei den Anti-Hämagglutinin-MAK, kam - abgesehen vom Isolat A/Eq/Fontainebleu/79, das mit jedem RDE-behandelten MAK mindestens eine Stufe höher reagierte - nicht zur Beobachtung.

4.3.1.3. Vergleichende Untersuchungen mit Protein-A-gereinigten Asciten

Die MAK wurden analog den Anti-Hämagglutinin-MAK mittels Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt. Durch die Säulendurchführung ergab sich wiederum eine Verdünnung von 1:10.

Die Ergebnisse, in Tabelle 9 zusammengefaßt, überraschten: In völligem Gegensatz zur Wirkung der Protein-A-Reinigung auf die Anti-Hämagglutinin-Klone sanken im Falle der Anti-Neuraminidase-MAK die Titerwerte extrem ab. So fiel der NI-Titer des MAK 2/2 von 1:32000 auf 1:20 (gegen A/Eq/Miami/1/63) ab. Die Neuraminidase des Isolats A/Eq/Sachyama/71 wurde von den MAK 1/1 (1:20), 1/2 (1:80), 4/2 (1:160), 4/3 (1:40) und 4/5 (1:80) erkannt und gehemmt, ebenso diejenige von A/Eq/Kentucky/1/81 von 1/2 (1:40), 1/1, 1/3, 1/4, 2/1, 2/3, 2/4, 4/3 und 4/5, alle mit einem Titer von 1:20.

Ähnliche Werte wie diese beiden Stämme wiesen nun auch A/Eq/California/1/76 - 1/1 (1:20), 1/3 (1:20), 1/4 (1:40), 2/2 (1:20), 2/3 (1:40) - und A/Eq/Algier/1/72 - 1/3 (1:20), 1/4 (1:20) und 2/2 (1:20) - auf. Diese Beobachtung war bei inaktivierten und RDE-behandelten Asciten noch nicht gemacht

Antigene	MAK																Anti N8
A/Eq/Miami/1/63	32	32	16	64	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	16	320
A/Eq/Detroit/63	32	32	32	64	32	16	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	640
A/Eq/Uruguay/63	32	32	32	64	32	32	32	64	32	32	64	32	32	32	32	32	1280
A/Eq/Milano/2/63	64	32	32	64	64	32	32	64	32	64	64	64	64	64	64	64	640
A/Eq/France/67	16	16	16	32	32	16	32	32	32	16	32	32	16	16	16	16	640
A/Eq/Sao Paulo/2/69	64	32	32	64	32	32	32	32	32	32	32	32	32	64	32	32	1280
A/Eq/Sachyama/71	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	640
A/Eq/Algier/1/72	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	8	8	8	8	640
A/Eq/California/1/76	16	16	16	32	16	16	32	32	32	16	32	32	8	8	8	8	2560
A/Eq/Newmarket/10/76	16	16	16	32	32	32	32	64	128	16	64	128	16	32	32	16	1280
A/Eq/Kaskadeur/78	16	16	16	16	32	16	32	32	32	8	32	32	8	16	16	16	1280
A/Eq/Fontainebleu/79	32	32	32	64	32	32	32	64	64	32	64	64	32	64	64	64	1280
A/Eq/Solvalla/79	64	32	32	64	32	32	32	32	64	16	32	64	16	32	32	32	640
A/Eq/Switz/2225/79	32	32	16	32	32	32	32	64	64	32	64	64	32	32	32	32	640
A/Eq/Romania/1/80	16	16	16	32	32	16	32	32	32	16	32	32	16	16	16	8	640
A/Eq/Kentucky/1/81	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	640
A/Eq/Aby/83	32	32	32	64	32	32	32	32	64	32	32	64	32	32	32	16	1280

Tabelle 8: Reaktionen im NI-Test von Influenza A/Equi-2-Stämmen (H3N8) mit MAK gegen die Neuraminidase von A/Eq/Miami/1/63.

MAK: Asciten, RDE-behandelt, 1:1000 in PBS + BSA + Na-azid.

Antigene	MAK	1/1	1/2	1/3	1/4	2/1	2/2	2/3	2/4	4/2	4/3	4/5	Anti N8
A/Eq/Miami/1/63		80	640	40	80	2560	20	40	160	1280	160	320	320
A/Eq/Detroit/63		80	1280	40	80	2560	80	160	320	2560	160	320	1280
A/Eq/Uruguay/63		80	2560	160	160	320	320	320	640	2560	320	1280	1280
A/Eq/Milano/2/63		160	1280	80	160	160	40	160	320	1280	320	320	640
A/Eq/France/67		40	640	40	80	160	40	160	320	1280	160	640	640
A/Eq/Sao Paulo/2/69		80	640	40	80	640	40	80	320	2560	160	320	1280
A/Eq/Sachyama/71		20	80	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160	40	80	640
A/Eq/Algier/1/72		40	320	20	20	160	20	40	80	320	160	320	640
A/Eq/California/1/76		20	320	20	40	80	20	40	80	320	160	160	2560
A/Eq/Newmarket/10/76		80	1280	40	80	1280	40	80	160	640	160	160	640
A/Eq/Kaskadeur/78		80	640	40	80	2560	40	80	160	1280	80	320	640
A/Eq/Fontainebleu/79		40	1280	40	80	80	20	80	160	640	160	640	1280
A/Eq/Solvalla/79		80	2560	40	80	2560	40	80	160	1280	320	320	1280
A/Eq/Switz/2225/79		160	1280	160	160	320	160	320	640	1280	640	1280	640
A/Eq/Romania/1/80		160	2560	160	320	5120	80	160	320	1280	640	640	640
A/Eq/Kentucky/1/81		20	40	20	20	20	20	20	20	<20	20	20	320
A/Eq/Aby/83		40	160	40	160	5120	40	40	320	640	160	320	1280

Tabelle 9: Reaktionen im NI-Test von Influenza A/Equi-2-Stämmen (H3N8) mit MAK gegen die Neuraminidase von A/Eq/Miami/1/63.

MAK: Asciten, Protein-A-gereinigt.

Angegeben sind die reziproken Titerwerte.

worden.

Alle übrigen Stämme reagierten mit dem Klon 1/1 in einer Breite von $\pm$ einer Titerstufe, verglichen mit A/Eq/Miami/1/63.

Bei den Reaktionen mit dem MAK 1/2 markierten wiederum A/Eq/Kentucky/1/81 und A/Eq/Sachyama/71 die niedrigsten Titer, die übrigen Stämme gruppieren sich im Bereich von $\pm$ zwei Titerstufen um A/Eq/Miami/1/63.

Vom MAK 1/3 wurde A/Eq/Sachyama/71 - wie auch von 1/4 - nicht erkannt, A/Eq/Algier/71 und A/Eq/Kentucky/1/81 jedoch mit je 1:20.

Die übrigen Isolate reagierten ähnlich wie A/Eq/Miami/1/63. Konstant zwei Titerstufen höher als A/Eq/Miami/1/63 reagierte innerhalb der MAK 1/1 bis 1/4 das Isolat A/Eq/Romania/1/80. Diesem Stamm ähnlich reagierten die Stämme A/Eq/Milano/2/63, A/Eq/Uruguay/63 und A/Eq/Switz/2225/79.

Von den MAK der Gruppe 2/1 bis 2/4 erkannte keiner A/Eq/Sachyama/71, A/Eq/Kentucky/1/81 wurde einheitlich 1:20 gehemmt.

Die höchsten NI-Titer wies A/Eq/Miami/1/63 mit dem MAK 2/1 auf: 1:2560. Ausgehend von diesem Wert ließ sich eine Einteilung der Stämme in zwei Gruppen vornehmen.

Gruppe 1 reagierte wie A/Eq/Miami/1/63 im Bereich von $\pm$ zwei Titerstufen: A/Eq/Kaskadeur/78, A/Eq/Newmarket/10/76, A/Eq/Romania/1/80, A/Eq/Solvalla/79, A/Eq/Aby/83 und A/Eq/Detroit/63. Zur Gruppe 2 gehörten die übrigen sieben Stämme, deren Reaktionstiter deutlich niedriger lagen. Innerhalb dieser Gruppe reagierten A/Eq/Switz/2225/79 und A/Eq/Uruguay/63 mit 1:320 am höchsten, A/Eq/Algier/1/72, A/Eq/France/67 und A/Eq/Milano/2/63 lagen mit 1:160 eine Titerstufe niedriger. Die niedrigsten Titer wurden von A/Eq/California/1/76 und A/Eq/Fontainebleu/79 mit 1:80 markiert. (Abbildung 5)

Deutlich einheitlichere Reaktionen lieferten die NI-Tests mit den MAK 2/2, 2/3 und 2/4: A/Eq/Miami/1/63 reagierte merklich niedriger (1:20; 1:40; 1:160), das Gros der übrigen Stämme jeweils gleich oder zwei Titerstufen höher.

Aus der Reihe fielen wiederum A/Eq/Uruguay/63 und A/Eq/Switz/2225/79 mit dreifach höheren Titern als A/Eq/Miami/1/63.

Innerhalb der Gruppe der MAK 4/2, 4/3 und 4/5 reagierte

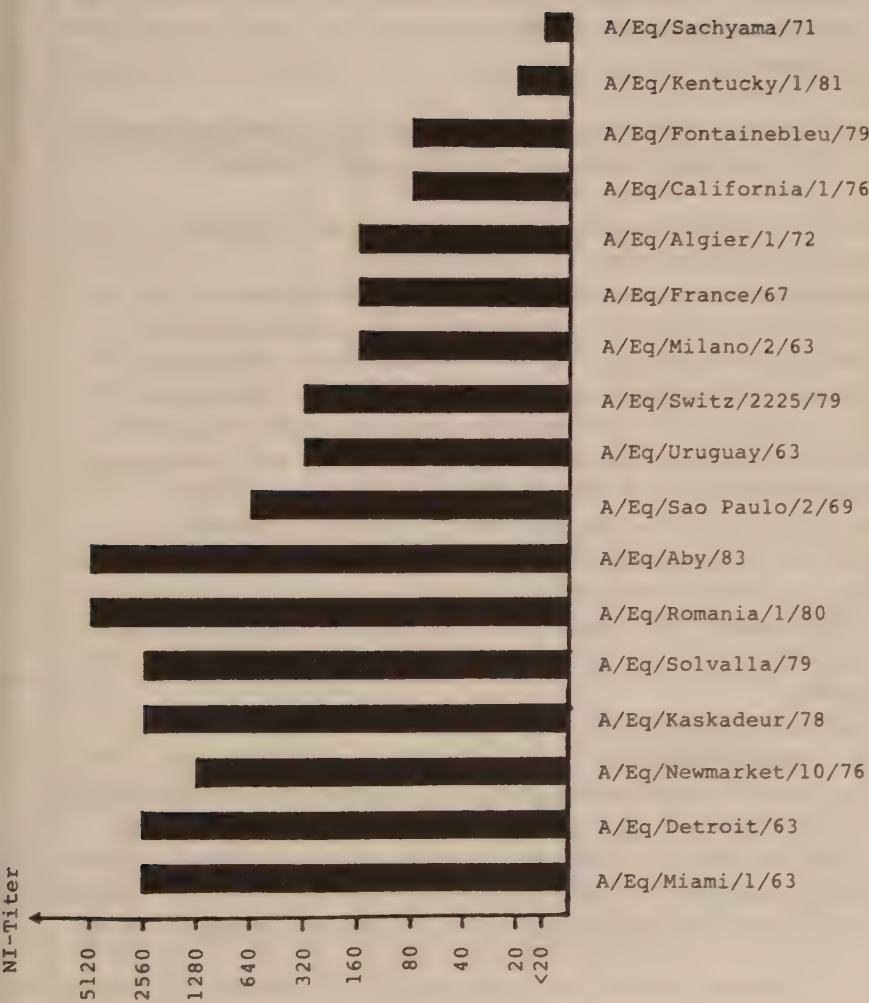


Abbildung 5: Reaktionen des MAK 2/1 (Ascites, Protein-A-gereinigt) mit A/Equi-2-Stämmen (H3N8).
 Angegeben sind die reziproken Titerwerte.

A/Eq/Miami/1/63 mit 4/2 am höchsten: 1:1280.

A/Eq/Kentucky/1/81 wurde von 4/2 nicht erkannt, A/Eq/Sachyama/71 reagierte mit 1:160, A/Eq/Algier/1/72 und A/Eq/California/1/76 jeweils mit 1:320.

Die übrigen Stämme reagierten wiederum im Bereich $\pm$ einer Titerstufe.

Einheitlichkeit war auch das vorherrschende Charakteristikum bei den MAK 4/3 und 4/5: A/Eq/Miami/1/63 reagierte mit 1:160 bzw. 1:320, alle anderen Stämme exklusive A/Eq/Kentucky/1/81 und A/Eq/Sachyama/71 gleich oder um ein bis zwei Stufen höher oder niedriger.

4.3.1.4. Vergleichende Untersuchungen mit Protein-A-gereinigten und RDE-behandelten Asciten (Tabelle 10)

Analog den hämagglutinationshemmenden Klonen wurden die Protein-A-gereinigten Asciten RDE-behandelt.

Auf Grund des daraus resultierenden Verdünnungsschrittes erscheint ein direkter Titervergleich der Klone zwischen inaktiviertem Ascites und RDE-behandeltem Ascites nicht angebracht. Weiterhin war von vorneherein klar, daß ebenfalls aus diesem Grund bedeutend mehr Isolate nicht mehr gehemmt werden würden, ein Resultat also, das nicht auf mangelnder Epitopverwandschaft mit A/Eq/Miami/1/63 beruhen würde.

Entsprechend wurden von dem MAK 1/1 und 1/4 nunmehr A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Romania/1/80, A/Eq/Detroit/63, A/Eq/Milano/2/63 und A/Eq/Switz/2225/79 gerade noch mit einem Titer von 1:200 gehemmt. Denselben ergab der MAK 1/4 mit A/Eq/Uruguay/63, während der MAK 1/3 nur diesen Stamm und A/Eq/Romania/1/80 hemmte.

Bei den Reaktionen der MAK 2/1 bis 2/4 mit A/Eq/Miami/1/63 markierte wiederum 2/1 mit dem NI-Titer von 1:3200 den höchsten Wert. Eine Gruppeneinteilung wie beim unbehandelten Eluat ergab folgende Verschiebung: außer A/Eq/Kentucky/1/81 und A/Eq/Sachyama/71 wichen nur noch vier weitere Stämme in ihrem Reaktionsmuster von der Gruppe um A/Eq/Miami/1/63 ab: A/Eq/Algier/1/72, A/Eq/Fontainebleu/79 und A/Eq/California/1/76 mit

Antigene	MAK	1/1	1/2	1/3	1/4	2/1	2/2	2/3	2/4	4/2	4/3	4/5	Anti N8
A/Eq/Miami/1/63		200	800	<200	200	3200	<200	<200	400	3200	400	800	320
A/Eq/Detroit/63		200	1600	<200	200	3200	<200	400	800	3200	400	800	640
A/Eq/Uruguay/63		<200	1600	200	200	800	200	200	800	1600	200	800	640
A/Eq/Milano/2/63		200	3200	<200	200	400	<200	200	400	3200	400	800	640
A/Eq/France/67		<200	400	<200	<200	800	<200	400	800	3200	400	1600	640
A/Eq/Sao Paulo/2/69		<200	200	<200	<200	1600	<200	<200	800	1600	400	800	1280
A/Eq/Sachyama/71		<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	640
A/Eq/Algier/1/72		<200	<200	<200	<200	200	<200	<200	<200	400	200	400	320
A/Eq/California/1/76		<200	200	<200	<200	200	<200	<200	200	800	<200	400	2560
A/Eq/Newmarket/10/76		<200	800	<200	<200	1600	<200	<200	200	800	400	400	1280
A/Eq/Kaskadeur/78		<200	200	<200	<200	3200	<200	<200	400	1600	200	400	1280
A/Eq/Fontainebleu/79		<200	800	<200	<200	200	<200	200	200	800	400	800	1280
A/Eq/Solvalla/79		<200	1600	<200	<200	1600	<200	200	400	1600	200	400	1280
A/Eq/Switz/2225/79		200	1600	<200	200	800	<200	400	800	800	400	800	640
A/Eq/Romania/1/80		200	1600	200	200	6400	200	200	400	3200	400	800	640
A/Eq/Kentucky/1/81		<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	640
A/Eq/Aby/83		<200	200	<200	<200	6400	200	200	400	800	400	800	1280

Tabelle 10: Reaktionen im NI-Test von Influenza A/Equi-2-Stämmen (H3N8) mit MAK gegen Neuraminidase von A/Eq/Miami/1/63.

MAK: Asciten, Protein-A-gereinigt und RDE-behandelt.
 Angegeben sind die reziproken Titerwerte.

1:200 und A/Eq/Milano/2/63 mit 1:400 (Abbildung 6).

Von den Klonen 2/2 und 2/3 wurde A/Eq/Miami/1/63 nach RDE-Behandlung nicht mehr erkannt. Bei 2/2 beliefen sich die höchsten Titerwerte auf 1:200 (A/Eq/Romania/1/80, A/Eq/Aby/83, A/Eq/Uruguay/63), bei 2/3 auf 1:400 (A/Eq/Detroit/63, A/Eq/France/67, A/Eq/Switz/2225/79). Der MAK 2/4 hemmte A/Eq/Miami/1/63 wieder mit einem Titer von 1:400, die übrigen Stämme reagierten im Bereich einer Titerstufe.

Innerhalb der Gruppe der MAK 4/2, 4/3 und 4/5 reagierte wiederum 4/2 am höchsten mit A/Eq/Miami/1/63: 1:3200. Verglichen mit diesem Wert wurde A/Eq/Algier/1/72 ein weiteres Mal mehr als zwei Titerstufen niedriger gehemmt.

A/Eq/Sachyama/71 und A/Eq/Kentucky/1/81 wurden wie bei 2/4, 4/3 und 4/5 nicht erkannt.

Entsprechend den NI-Titern der MAK 4/3 und 4/5 mit A/Eq/Miami/1/63 ließen die Reaktionen dieser beiden MAK mit den Stämmen analog den Reaktionen mit unbehandeltem Eluat im Bereich ± einer Titerstufe einheitliche Reaktionsmuster erkennen.

4.4. Neutralisationstest

Die Allantoisflüssigkeit derjenigen Eier, die mit der Virus-suspension in der Verdünnung 10^{-4} , 10^{-6} und 10^{-8} als Kontrolle beimpft worden waren, wiesen HA-Titer von 1:128 auf.

Die Allantoisflüssigkeiten derjenigen Eier, die mit einer Mischung aus dem MAK 7/12 bzw. 8/4 und A/Eq/Miami/1/63 in der Verdünnung 10^{-4} , 10^{-6} und 10^{-8} beimpft worden waren, wiesen einheitlich keinerlei hämagglutinierende Aktivitäten auf. Die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der neutralisierenden Eigenschaften der hämagglutinationshemmenden MAK 7/12 und 8/4 müssen deshalb als positiv bewertet werden.

Dagegen wiesen die Allantoisflüssigkeiten derjenigen Eier, die mit einer Anti-Neuraminidase-MAK/Virus-Mischung beimpft worden waren, HA-Titer von 1:128 auf. Diesen MAK konnten daher neutralisierende Fähigkeiten eindeutig abgesprochen werden.

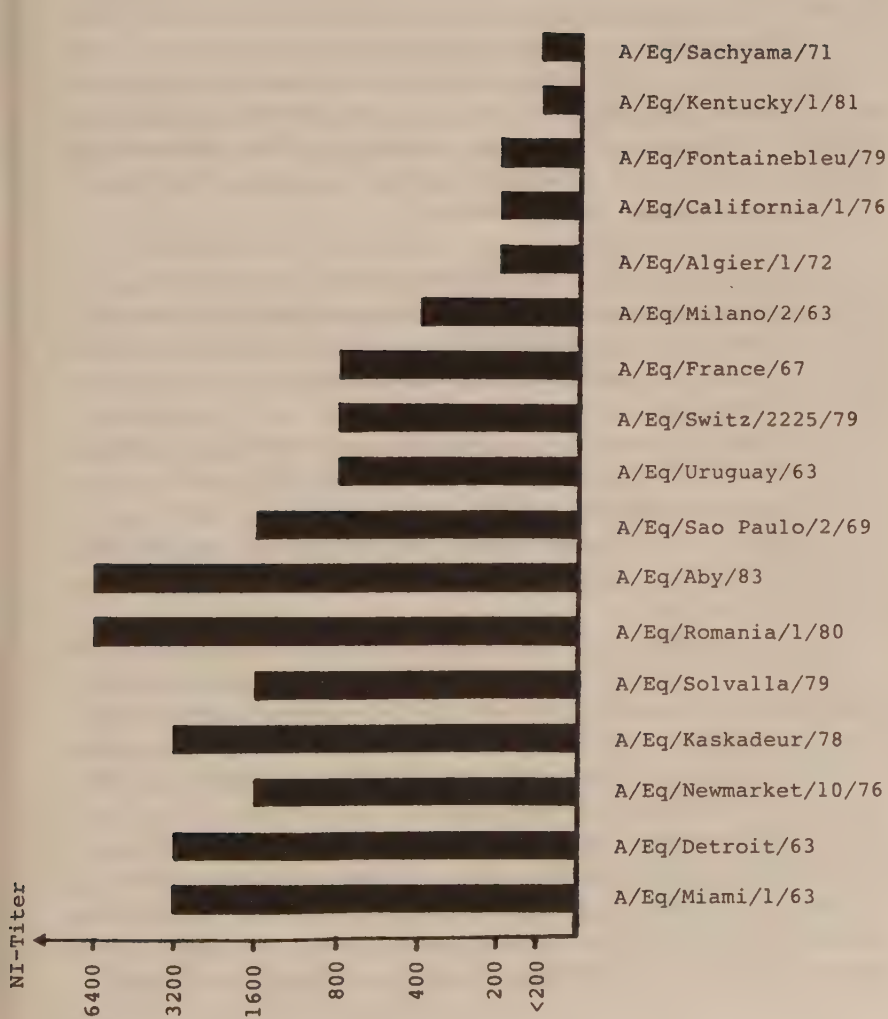


Abbildung 6: Reaktionen des MAK 2/1 (Ascites, Protein-A-gereinigt und RDE-behandelt) mit A/Equi-2-Stämmen (H3N8). Angegeben sind die reziproken Titerwerte.

5. Besprechung der Ergebnisse

Auf Grund der Ergebnisse der HI-Tests mit den MAK 3/1, 3/3, 3/5 und 8/4 (inaktivierte Asciten) konnte gezeigt werden, daß bei den Virusisolaten A/Eq/France/67, A/Eq/Sachyama/71 und A/Eq/Algier/1/72 eine deutliche Drift vom Prototyp A/Eq/Miami/1/63 stattgefunden hat. Die übrigen Isolate reagierten mit den MAK wie A/Eq/Miami/1/63.

Ein MAK (7/12) erkannte lediglich A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Detroit/63, A/Eq/Milano/2/63 und A/Eq/Switz/2225/79.

Aus diesen Tests geht hervor, daß die MAK verschiedene Epitope erkennen, und daß sich die einzelnen Stämme in diesen Epitopen unterscheiden. Die von den MAK 3/1, 3/3, 3/5 und 8/4 erkannten und für die Kreuzreaktionen verantwortlichen Epitope zeigen Konstanz über 20 Jahre.

Zur Ausschaltung eventueller unspezifischer Inhibitoren wurden die Asciten verschiedenen Reinigungsschritten unterzogen. Neben einer Hitzeinaktivierung und einer RDE-Behandlung wurden die Asciten zusätzlich Protein-A-gereinigt und diese Präparationen ebenfalls RDE-behandelt.

Auf Grund der Erfahrungen aus der Routinediagnostik wurden Titerenkungen erwartet, die jedoch nur bei den Reaktionen mit den Isolaten A/Eq/France/67, A/Eq/Sachyama/71 und A/Eq/Algier/1/72 eintraten. Diese Isolate wurden von den MAK nicht mehr erkannt, die übrigen MAK wiesen dagegen höhere Reaktionstiter auf.

Die Vermutung, daß die HI-Reaktionen der inaktivierten Asciten mit diesen drei Isolaten auf unspezifischen Inhibitoren beruhen könnten, wurde durch die Protein-A-Reinigung widerlegt. Auf welche Ursachen jedoch die Titersteigerungen bei der Mehrzahl der MAK nach der RDE-Behandlung zurückzuführen ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine mögliche Erklärung für die Titerunterschiede würde eine aus den Reinigungsverfahren resultierende Aviditätsbeeinflussung der Antikörper in Abhängigkeit von ihrer Spezifität bieten. Die Avidität von niedrigspezifischen MAK würde demnach infolge der bei der RDE-Behandlung auftretenden sterischen

Veränderungen an den Antikörpern zu-, die Avidität der hochspezifischen MAK jedoch abnehmen.

So konnten beim MAK 3/5 am deutlichsten Titersteigerungen auf Grund der verschiedenen Reinigungsverfahren beobachtet werden. Ihm müßte daher von den kreuzreagierenden MAK die niedrigste Spezifität zugesprochen werden.

Nach der Protein-A-Reinigung wies dieser MAK die höchsten Reaktionstiter auf. Durch die SDS-PAGE ließ sich bei diesem wie bei den übrigen MAK der vorliegenden Arbeit die hohe Reinheit dokumentieren. Die Durchführung Antigen-vergleichender HI-Tests mit MAK scheint deshalb am geeignetsten. Eine Protein-A-Reinigung von Seren im Rahmen der Routinediagnostik bietet sich ebenso an. Eine weitere Reinigung der Protein-A-Eluat durch RDE-Behandlung erübrigt sich.

Im Neutralisationstest konnte bei den hämagglutinationshemmenden MAK neutralisierende Aktivität nachgewiesen werden. Daß hämagglutinationshemmende Antikörper auch neutralisierende Eigenschaften besitzen können, ist bekannt (Gerhard und Webster, 1978). Yoden et al. (1985) konnten jedoch zeigen, daß Fab-Fragmente von Protein-A-gereinigten hämagglutinationshemmenden MAK nur dann auch neutralisierende Eigenschaften besitzen, wenn sie bivalent auf dem Hämagglutinin binden. Durch dieses bivalente Binden wird möglicherweise eine Konformationsänderung des Hämagglutininmoleküls verhindert, welche für die Fusion der Virusmembran mit der endosomalen Vesikelmembran Voraussetzung ist. Bei solchen Epitopen könnte es sich um diskontinuierliche konformationelle Epitope handeln, die durch Faltung der Proteinstruktur entstehen (Pollock et al., 1984). Die neutralisierende Aktivität der hämagglutinationshemmenden MAK dieser Arbeit könnte demnach aus einer Blockade der an die Wirtszelle bindenden Region (receptor site des Hämagglutinins) oder aus einer Blockade der Konformationsänderung resultieren. Der von Yoden et al. (1985) angesprochene Mechanismus einer Beeinflussung der virusinduzierten Transkriptase-Aktivität in der infizierten Zelle erscheint hier nur wenig relevant.

Auf Grund der hohen Spezifität und der neutralisierenden Aktivität würden sich Protein-A-gereinigte Asciten für Untersuchungen der Antigenvariation equiner Feldisolate im Neutralisationstest anbieten (Yamagishi et al., 1981). Zudem wären vorliegende MAK für eine in vitro-Selektion von Varianten ausgewählter Stämme geeignet (Laver et al., 1979). Diese könnten dann mit sequenzanalytischen Techniken (Scholtissek et al., 1977) weiter untersucht werden, um direkte Zusammenhänge zwischen Genom- und Antigenvariation zu studieren.

Eine Untersuchung von Influenza A/Equi-2-Isolaten mit MAK liegt von Hinshaw et al. (1983) vor. Die Autoren untersuchten mit fünf MAK, die gegen das Hämagglutinin von A/Eq/Miami/1/63 hergestellt worden waren, neben anderen Virusisolaten die Stämme A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Uruquay/63, A/Eq/France/67, A/Eq/Sachyama/71, A/Eq/Algier/1/72, A/Eq/Kaskadeur/78, A/Eq/Fontainebleu/79, A/Eq/Switz/2225/79, A/Eq/Romania/1/80 und A/Eq/Kentucky/1/81 im HI-Test.

Das Reaktionsmuster dieser Isolate mit den MAK ähnelt dem mit den MAK 3/1, 3/3, 3/5, und 8/4. Zwei Stämme, A/Eq/Uruquay/63 und A/Eq/Algier/1/72 wurden von keinem der MAK erkannt, A/Eq/Sachyama/71 nur von einem einzigen MAK.

Auf Grund der Reaktionen der MAK 3/1, 3/3, 3/5 und 8/4 mit A/Eq/Uruquay/63 und A/Eq/Algier/1/72 kann die Existenz von mindestens einem weiteren gemeinsamen Epitop von A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Uruquay/63 und A/Eq/Algier/1/72 vermutet werden. Da es einen gemeinsamen Antigenort (cross reactive site) auf den Hämagglutininen von A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Uruquay/63 und A/Eq/Algier/1/72 geben muß - ansonsten wäre eine Klassifizierung dieser Stämme zur Equi-2-Subgruppe nicht möglich -, kann man davon ausgehen, daß die MAK 3/1, 3/3, 3/5, und 8/4 im Vergleich mit den fünf MAK von Hinshaw et al. (1983) Epitope erkennen, die sehr eng an diesen Antigenort gekoppelt sein müssen.

Die krasse Antigendrift des Isolats A/Eq/Sachyama/71 von A/Eq/Miami/1/63 ließ sich auf Grund von Untersuchungen mit Frettchenserum vermuten: ein- bzw. dreifachen Titerunterschied zwischen A/Eq/Miami/1/63 und A/Eq/Sachyama/71 im Kreuz-HI-Test mit spezifischen Frettchen-Antiserum konnten Thomson et al. (1977) feststellen. Vergleichbare Unterschiede zeigt ein Kreuz-HI-Test von Burrows und Denyer (1982). Ein HI-Test von Hinshaw et al. (1983), die mit Anti-A/Eq/Miami/1/63-Frettchenserum die Stämme A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Sachyama/71 und A/Eq/Algier/1/72 untersuchten, ließ auf Grund identischer Titer keine Antigendrift innerhalb dieser Isolate vermuten.

In derselben Testreihe wurden von Hinshaw et al. (1983) A/Eq/France/67, A/Eq/Uruguay/63, A/Eq/Kaskadeur/78, A/Eq/Fontainebleu/79, A/Eq/Switz/2225/79, A/Eq/Romania/1/80 und A/Eq/Kentucky/1/81 untersucht. Diese Isolate reagierten mit dem Anti-A/Eq/Miami/1/63-Serum deutlich niedriger. Außer im Falle A/Eq/France/67 wichen somit die Titer aus den Reaktionen mit dem Frettchenserum von den Titern aus den Reaktionen dieser Stämme mit den MAK 3/1, 3/3, 3/5 und 8/4 ab. Von Klingeborn et al. (1980) wurde mit Hilfe von Frettchenserum im Kreuz-HI-Test signifikante Antigendrift des Isolats A/Eq/Sollvalla/79 von A/Eq/Miami/1/63 nachgewiesen: im Serum-HI-Test trat ein vierfacher Titerunterschied auf. Diese Drift war aus den Reaktionen der MAK 3/1, 3/3, 3/5 und 8/4 mit diesem Isolat nicht ersichtlich, da die Titerwerte nahezu identisch mit den Werten von A/Eq/Miami/1/63 waren.

Unterschiedliches Reaktionsverhalten zeigen weiterhin die von Hinshaw et al. (1983) verwendeten MAK und spezifische Frettchenserum von Pereira et al. (1972) mit den Stämmen A/Eq/Miami/1/63 und A/Eq/Sao Paulo/69: beide Stämme werden von den MAK mit fast identischen Titern gehemmt, im Kreuz-HI-Test mit Frettchenserum treten jedoch dreifache und größere Titerunterschiede auf.

Solch divergierende Resultate wären dadurch erklärbar, daß von polyklonalen Antikörpern zusätzliche Epitope erkannt werden, Epitope also, mit denen weder die MAK vorliegender Ar-

beit noch die von Hinshaw et al. (1983) verwendeten reagieren. Weiterhin wären Konformationsänderungen innerhalb des Hämagglutininmoleküls bei gleichzeitigem Binden mehrerer Antikörper denkbar. Dies wurde von Lubeck und Gerhard (1982) für das Influenza A/PR/8/34-Hämagglutinin (H1N1) beschrieben. Nur auf Grund einer solchen Konformationsänderung könnte es für Antikörper möglich sein, Epitope auf den Antigenorten zu erkennen und daran zu binden. Diese Konformationsänderungen können natürlich nur bei polyklonalen, nicht aber bei monoklonalen Antikörpern auftreten.

Wenn also die Erkennung kreuzreagierender Antigenorte bei bestimmten Stämmen nur polyklonalen Seren vorbehalten ist, so entspricht das der Meinung von Burrows and Denyer (1982) und Pereira et al. (1985), die MAK für zu spezifisch für serologische Routinetypisierung und Subtypisierung von Influenza-Isolaten erachten.

Geht man jedoch davon aus, daß es bei A/Equi-2-Isolaten innerhalb des oben angesprochenen Antigenortes (cross reactive site) mindestens ein gemeinsames Epitop gibt, und dieses auch von einem einzelnen MAK erkannt werden kann, so könnte man angesichts des breiten Reaktionsvermögens der MAK 3/1, 3/3, 3/5 und 8/4 vorliegender Arbeit - sie erkennen außer A/Eq/Sachyama/71 alle A/Equi-2-Stämme - ihnen die Fähigkeit zur Typisierung equiner Influenza-isolate "Typ H3" durchaus zusprechen.

Im Gegensatz zu diesen MAK reagierte der MAK 7/12 mit stamm-spezifischen Epitopen (strain specific sites) der Isolate A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Detroit/63, A/Eq/Milano/2/63 und A/Eq/Switz/2225/79.

Hinshaw et al. (1983) vermuteten auf Grund von Untersuchungen mit Tween-Äther-behandelten Antigenen und Frettschenseren im Kreuz-HI-Test eine enge Verwandtschaft von A/Eq/Switz/2225/79 und A/Eq/Miami/1/63. Dies konnte durch die Reaktionen dieser Isolate mit dem MAK 7/12 bestätigt werden.

Weiterhin nahmen Hinshaw et al. (1983) an, daß in den USA seit der Isolierung von A/Eq/Miami/1/63 bis 1983 kein Virusstamm entdeckt wurde, der ebenfalls wie A/Eq/Switz/2225/79

reagiert. Diese Annahme wurde durch die Reaktion des MAK 7/12 mit A/Eq/Detroit/63 widerlegt.

Sechs Stämme wurden Tween-Äther-behandelt. Es konnte gezeigt werden, daß (a) Antigene unterschiedlich auf Tween-Äther-Behandlung reagieren, d.h. die Zugänglichkeit von Epitopen für Antikörper durch die Freisetzung des Hämagglutinins unterschiedlich verbessert wurde, und (b) die Erkennung eines stammspezifischen Epitops von einem MAK durch die Tween-Äther-Behandlung deutlich gesteigert werden kann.

Am deutlichsten wurde dies aus den Reaktionen des MAK 7/12. Er erkannte die Epitope auf A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Detroit/63 und A/Eq/Switz/2225/79 nach der Tween-Äther-Behandlung eindeutig besser, was an signifikant erhöhten Titern ablesbar war.

Untersuchungen über die Antigenvariation der Neuraminidase N8 von Influenza A/Equi-2-Isolaten mit monoklonalen Antikörpern sind nicht bekannt.

Die Anti-Neuraminidase-MAK vorliegender Arbeit wurden nach ihrer Fähigkeit selektiert, die enzymatische Aktivität der Neuraminidase zu blockieren. Nach Fazekas de St.Groth (1963) und Colman et al. (1983) gruppieren sich die antigenetischen Determinanten um das enzymatisch aktive Zentrum herum, an die jedoch oftmals MAK binden, ohne die Neuraminidase zu blockieren (Webster et al., 1984). Man kann deshalb davon ausgehen, daß die hier beschriebenen MAK an einem Epitop im oder sehr nahe am Zentrum binden.

Protein-A-gereinigte Asciten von Anti-NA-MAK wurden auf neutralisierende Fähigkeit hin überprüft. Auf Grund der Ergebnisse des Neutralisationstests muß ihnen diese abgesprochen werden.

Nach Kilbourne et al. (1968) vermögen jedoch nur hochkonzentrierte Anti-NA-Antikörper Virus zu neutralisieren. Inwiefern bei den vorliegenden MAK Virus-neutralisierende Aktivität durch Konzentrierung erreicht werden könnte, wurde nicht überprüft.

Hinshaw et al. (1983) vermuteten eine nur geringe Variation innerhalb der equinen N8-Isolate. Diese Vermutung ließ sich nicht bestätigen. Die Ergebnisse der NI-Tests mit inaktivierten Asciten zeigen bei zwei Isolaten deutliche Drift auf: A/Eq/Sachyama/71 und A/Eq/Kentucky/1/81 wurden in der Ausgangsverdünnung von keinem der MAK erkannt.

Für den Stamm A/Eq/Kentucky/1/81 ist dies besonders überraschend, da er neben A/Eq/Miami/1/63 als weiterer Referenzstamm für Influenza A/Equi-2-Stämme diskutiert wird (Hinshaw et al., 1983).

Auch bei diesen Reaktionen ließen die Ergebnisse mit polyklonalen Antikörpern (Anti-N8-Ziegenserum) und mit MAK deutliche Diskrepanzen erkennen: A/Eq/Miami/1/63 wurde von den MAK durchschnittlich sehr gut gehemmt, A/Eq/Sachyama/71 und A/Eq/Kentucky/1/81 in der angegebenen Verdünnung überhaupt nicht. Alle drei Stämme reagierten jedoch mit dem polyklonalen Kontrollserum gleich.

Eine deutliche Antigenvariation zwischen A/Eq/Miami/1/63 und A/Eq/Solvalla/79, die von Klingeborn et al. (1980) beschrieben wird, kann nur durch die Reaktionen der MAK 1/1 und 1/4 bestätigt werden, die übrigen Reaktionen lassen lediglich Titerunterschiede von zwei Stufen erkennen.

Im Gegensatz zu den Anti-Hämagglutinin-MAK war durch die RDE-Behandlung der MAK kein die Titer steigernder Effekt zu beobachten, vielmehr blieben die Titer gleich.

Nach der Protein-A-Reinigung kam es zu einem starken Abfall der NI-Titer. Als Erklärung für die extremen Titerensenkungen nach der Protein-A-Reinigung lassen sich zwei mögliche Ursachen anführen: einmal wären im Ascites Substanzen denkbar, die in Anwesenheit von Antikörpern die Neuraminidase-Aktivität blockieren bzw. die Hemmung derselben durch die Antikörper erheblich verstärken könnten. Da ein negativer Ascites in allen Reaktionen negativ reagierte, wären diese Substanzen ohne Antikörper nicht in der Lage eine Hemmreaktion auszuführen.

Weiterhin könnte eine pH-bedingte Konfigurationsänderung der Anti-Neuraminidase-MAK die Ursache sein: der Elutionspuffer B weist einen pH von 3,0 auf. Eine durch diesen niedrigen pH

bedingte Konfigurationsänderung der Immunglobuline und ein daraus resultierendes verändertes Bindungsverhalten der MAK wären durchaus vorstellbar.

Das unveränderte bzw. verbesserte Bindungsverhalten der Anti-Hämagglutinin-MAK nach der Protein-A-Reinigung wäre dann mit einer unterschiedlichen Empfindsamkeit der zu hemmenden Reaktion erklärbar. Konnte bei den Anti-HA-MAK die Sensibilität gegenüber den Epitopen durch Protein-A-Reinigung gesteigert werden, so wäre es denkbar, daß dieser Reinigungsschritt bei den Anti-NA-MAK auf Grund einer höheren Empfindlichkeit der Neuraminidase den gegenteiligen Effekt erzielte. Auf Grund der Ergebnisse der NI-Tests mit Protein-A-gereinigten Asciten ließ sich bei zwei weiteren Isolaten - A/Eq/California/1/76 und A/Eq/Fontainbleu/79 (vgl. Abbildung 6) - ein von A/Eq/Miami/1/63 abweichendes Reaktionsmuster feststellen. Nach der RDE-Behandlung der Protein-A-gereinigten Asciten unterschieden sich zusätzlich die Stämme A/Eq/Milano/2/63 und A/Eq/Algier/1/72 (vgl. Abbildung 7) im Reaktionsverhalten von A/Eq/Miami/1/63. Die übrigen Reaktionen der Anti-NA-MAK wurden durch die RDE-Behandlung der Protein-A-gereinigten Asciten nicht beeinflusst.

Diese Variation innerhalb der Neuraminidase überrascht angesichts der Tatsache, daß auf dem Enzym infolge der eher untergeordneten Rolle - das Hämagglutinin ist verantwortlich für Infektion und Penetration - ein weit geringerer Selektionsdruck liegen dürfte. Möglicherweise ist jedoch auch die festgestellte Variation biologisch ohne Relevanz und überhaupt nur auf Grund der hohen Spezifität der MAK ersichtlich.

Alle durchgeführten HI- und NI-Tests lassen antigenetische Drift bei equinen H3N8-Stämmen erkennen. Verglichen mit dem humanen H3-Hämagglutinin (Webster und Laver, 1980) und der humanen N2-Neuraminidase (Webster et al., 1982b) ist die Variation jedoch geringer ausgeprägt.

Influenza-Epizootien können daher nicht alleinig auf dauernde antigenetische Veränderungen dieser Oberflächenenzyme zurückgeführt werden. Vielmehr scheint, neben der Notwendig-

keit einer hohen Immunogenität des in der Vakzine vorhandenen Virusmaterials, einer verbesserten Impfmoral (kürzere Intervalle) die größte Bedeutung zuzukommen.

Weitere kontrollierende Untersuchungen der Antigendrift innerhalb der Pferdepopulation erscheinen daher im Hinblick auf die Aktualisierung von Vakzinen für die Zukunft unumgänglich.

6. Zusammenfassung

Die antigenetische Variation des Hämagglutinins (HA) und der Neuraminidase (NA) von 17 Influenza A/Equi-2-Stämmen (H3N8) wurde mit monoklonalen Antikörpern (MAK) untersucht. Als Testsysteme dienten der Hämagglutinations-Inhibitionstest, der Neuraminidase-Inhibitionstest sowie ein Neutralisationstest. Es wurden fünf MAK gegen das Hämagglutinin und elf MAK gegen die Neuraminidase von A/Eq/Miami/1/63 (H3N8) hergestellt. Die für den Test verwendete Ascitesflüssigkeit wurde verschiedenen Verfahren unterzogen: Hitzeinaktivierung, RDE-Behandlung, Protein-A-Reinigung sowie RDE-Behandlung Protein-A-gereinigter MAK. Die Auswirkungen dieser Behandlungsverfahren auf die Reaktionen der MAK wurden untersucht.

Auf Grund der Ergebnisse der HI-Tests konnte gezeigt werden, daß drei Stämme signifikante Drift vom Referenzstamm A/Eq/Miami/1/63 aufweisen: A/Eq/France/67, A/Eq/Sachyama/71 und A/Eq/Algier/1/72. Die Reaktion dieser Stämme verlief mit den verschieden behandelten Asciten unterschiedlich. Das Isolat A/Eq/Sachyama/71 wurde bei allen Tests von keinem der Anti-HA-MAK erkannt. Mit den übrigen Stämmen reagierten die MAK (3/1, 3/3, 3/5 und 8/4) ähnlich wie mit A/Eq/Miami/1/63. An den Reaktionen eines MAK (3/5) ließen sich am deutlichsten Einflüsse der verschiedenen Reinigungsverfahren ablesen. Ausgehend von den Ergebnissen mit inaktivierten Asciten ließ sich eine Titersteigerung nach RDE-Behandlung feststellen. Die höchsten Titerwerte konnten mit Protein-A-gereinigten Asciten erzielt werden.

Ein MAK (7/12) erkannte ein stammspezifisches Epitop bei den Stämmen A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Detroit/63, A/Eq/Milano/2/63 und A/Eq/Switz/2225/79.

Sechs Stämme wurden Tween-Äther-behandelt. Es konnte gezeigt werden, daß die Reaktionen der MAK mit dem Antigen durch Tween-Äther-Behandlung des Antigens unterschiedlich beeinflußt werden können.

Auf Grund eines Neutralisationstests konnte den Anti-HA-MAK 7/12 und 8/4 neutralisierende Fähigkeit zugesprochen werden,

den Anti-Neuraminidase-MAK jedoch nicht.

Die Ergebnisse des Neuraminidase-Inhibitionstests zeigen bei zwei Isolaten - A/Eq/Sachyama/71 und A/Eq/Kentucky/1/81 - signifikante Drift vom Prototyp A/Eq/Miami/1/63 auf. Sie reagierten in der Ausgangsverdünnung kaum mit den Anti-NA-MAK. Die RDE-Behandlung der MAK blieb ohne Einfluß. Hingegen wurde nach der Protein-A-Reinigung eine drastische Titer senkung festgestellt. Auf Grund der Ergebnisse der NI-Tests mit Protein-A-gereinigten Asciten ließen zwei weitere Isolate - A/Eq/California/1/76 und A/Eq/Fontainebleu/79 - ein von A/Eq/Miami/1/63 abweichendes Reaktionsverhalten erkennen. Nach der RDE-Behandlung der Protein-A-gereinigten Asciten unterschieden sich zusätzlich die Stämme A/Eq/Milano/2/63 und A/Eq/Algier/1/72 im Reaktionsmuster von A/Eq/Miami/1/63. Auf die übrigen Reaktionen der MAK blieb die RDE-Behandlung der Protein-A-gereinigten Asciten ohne Einfluß.

Summary

Characterization and Differentiation of Equine 2 Influenza A Viruses with Monoclonal Antibodies

Antigenic variation in the hemagglutinin and the neuraminidase of 17 influenza viruses of the H3N8 subtype (equine 2) was analysed with monoclonal antibodies (mab) by hemagglutinin inhibition test (HI), neuraminidase inhibition test (NI) and neutralization test. Five mab's directed against the hemagglutinin and eleven mab's against the neuraminidase of A/Eq/Miami/1/63 (H3N8) were obtained.

Ascitic fluid containing these mab's was used for the assays after having been treated by four procedures: inactivation by heating to 56°C, treatment with RDE (receptor destroying enzyme), purification by protein-A-Sepharose affinity chromatography, and finally subsequent treatment of chromatographically purified ascitic fluid with RDE. The effect of these treatments to the reactions of the mab's were analysed. It could be shown, that the hemagglutinin of three strains was significantly drifted from the prototype A/Eq/Miami/1/63: A/Eq/France/67, A/Eq/Sachyama/71 and A/Eq/Algier/1/72.

These strains demonstrated various reactivity patterns with differently treated ascitic fluids. A/Eq/Sachyama/71 did not react at all with any of the mab's. Reactivity patterns of the other strains were similar to these of A/Eq/Miami/1/63. RDE-treatment of ascitic fluid resulted in higher HI-Titers. Highest titres could be obtained after protein-A-chromatography.

One mab (7/12) recognized a strain specific epitop on the hemagglutinin of A/Eq/Miami/1/63, A/Eq/Detroit/63, A/Eq/Milano/2/63 and A/Eq/Switz/2225/79, indicating that these viruses are closely related to each other.

Tween-ether-treatment of six strains resulted in different reactions with monoclonal antibodies, indicating that different epitopes are involved.

Two monoclonal antibodies to the hemagglutinin (7/12 and 8/4)

were shown to neutralize viral infectivity, whereas mab's to the neuraminidase did not.

The results of the NI-tests demonstrated variation in the neuraminidase of two strains: A/Eq/Sachyama/71 and A/Eq/Kentucky/1/81. They reacted poorly with any of the mab's to the neuraminidase of A/Eq/Miami/1/63.

After chromatography a dramatical decline of the NI-titres was observed. Now two additional strains - A/Eq/California/1/76 and A/Eq/Fontainebleu/79 - showed drift from A/Eq/Miami/1/63. Subsequent treating the ascitic fluid with receptor-destroying enzyme, tests revealed also variation in the neuraminidase of A/Eq/Milano/2/63 and A/Eq/Algier/1/72.

7. Literaturverzeichnis

Air, G.M., M.C. Els, L.E. Brown, W.G. Laver, R.G. Webster, 1985:

Location of antigenic sites on the three-dimensional structure of the influenza N2 virus neuraminidase.
Virology 145, 237-248

Anonymous, 1980:

A revision for the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum.
Bull. Wld. Hlth. Org. 58, 585-591

Anonymous, 1981a:

The ecology of influenza virus: a WHO Memorandum.
Bull. Wld. Hlth. Org. 59, 869-873

Anonymous, 1981b:

The role of genetic and molecular characterization of viruses in relation to influenza surveillance and epidemiology: a WHO Memorandum.
Bull. Wld. Hlth. Org. 59, 875-879

Arcus, Y.M., A.C. Knight, 1981:

Antigenic peptides of influenza virus hemagglutinin: Reactivity with virus-neutralizing antibodies.
Intervirology 15, 145-153

Aymard-Henry, M., M.T. Coleman, W.R. Dowdle, W.G. Laver, G.C. Schild, R.G. Webster, 1973:

Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures.
Bull. Wld. Hlth. Org. 48, 199-202

Bachmann, P.A., 1984:

Pferdeinfluenza

In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Rolle, M., Mayr, A.,
Enke Verlag, Stuttgart, 482-486

- Bean, W.J., Jr., N.J. Cox, A.P. Kendal, 1980:
Recombination of human influenza A viruses in nature.
Nature 284, 638-640
- Berlin, B.S., J.L. McQueen, E. Minuse, F.M. Davenport, 1963:
A method for increasing the sensitivity of the hem-
agglutination-inhibition test with equine influenza
virus.
Virology 21, 665-666
- Blok, J., G.M. Air, 1980a:
Sequence variations observed in the neuraminidases of
several strains of influenza virus.
In: Structure and variation in influenza virus,
Laver, W.G., Air, G.M. (eds), Elsevier, New York, 125-133
- Blok, J., G.M. Air, 1980b:
Comparative nucleotide sequences at the 3' end of the
neuraminidase gene from eleven influenza type A viruses.
Virology 107, 50-60
- Blok, J., G.M. Air, 1982a:
Variation in the membrane-insertion and "stalk" sequen-
ces in eight subtypes of influenza A virus neuraminidase.
Biochemistry 21, 4001-4007
- Blok, J., G.M. Air, 1982b:
Sequence variation at the 3' end of the neuraminidase
gene from 39 influenza type A viruses.
Virology 121, 211-229
- Bommeli, W., U. Kihm, J. Löhrer, H. Fey, 1980:
Die Wirksamkeit der Pferde-Influenza-Impfstoffe mit Be-
rücksichtigung des Tetanustoxoids der kombinierten Impf-
stoffe.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 122, 27-37

Breschkin, A.M., J. Ahern, D.O. White, 1981:

Antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin.
VIII. Topography of antigenic regions of influenza virus
hemagglutinin determined by competitive radioimmunoassay
with monoclonal antibodies.

Virology 113, 130-140

Brodeur, B.R., P. Tsang, Y. Larosese, 1984:

Parameters affecting ascites tumour formation in mice
and monoclonal antibody production.

J. Immun. Meth. 71, 265-272

Burrows, R., M. Denyer, D. Goodridge, F. Hamilton, 1981:

Field and laboratory studies of equine influenza viruses
isolated in 1979.

Vet. Rec. 109, 353-356

Burrows, R., M. Denyer, 1982:

Antigenic properties of some equine influenza viruses.

Arch. Virol. 73, 15-24

Burrows, R., D. Goodridge, M. Denyer, G. Hutchings, 1982:

Equine influenza infections in Great Britain 1979.

Vet. Rec. 110, 494-497

Caton, A.J., G.G. Brownlee, J.W. Yewdell, W. Gerhard, 1982:

The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34
hemagglutinin (H1 subtype).

Cell 31, 417-427

Colman, P.M., J.N. Varghese, W.G. Laver, 1983:

Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase.

Nature 303, 41-44

Cox, N.J., Z.S. Bai, A.P. Kendal, 1983:

Laboratory-based surveillance of influenza A (H1N1) and
A (H3N2) viruses in 1980-81: antigenic and genomic analyses.

Bull. Wld. Hlth. Org. 61, 143-152

- Daniels, R.S., A.R. Douglas, J.J. Skehel, M.D. Waterfield, J.A. Wilson, D.C. Wiley, 1983:
Studies on the influenza virus hemagglutinin in the pH 5-conformation.
In: The origin of pandemic influenza viruses,
Laver, W.G. (ed.), Elsevier, New York, 1-7
- Denyer, M.S., J.R. Crowther, R.C. Wardley, R. Burrows, 1984:
Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific antibodies against H7N7 and an H3N8 equine influenza virus.
J. Hyg. 93, 609-620
- Desselberger, U.S., K. Nakajima, P. Alifino, F.S. Pedersen, W.A. Haseltine, C. Hannoun, P. Palese, 1978:
Biochemical evidence that new influenza virus strains in nature may arise by recombination (reassortment).
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 3341-3345
- v.Deusen, R.A., V.S. Hinshaw, D.A. Senne, D. Pellacani, 1983:
Micro neuraminidase-inhibition assay for classification of influenza A virus neuraminidases.
Avian Dis. 27, 745-750
- Fazekas de St.Groth, S., 1963:
Steric inhibition: neutralization of a virus-borne enzyme.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, 674-687
- Fazekas de St.Groth, S., D. Scheidegger, 1980:
Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics.
J. Immun. Meth. 35, 1-21
- Gerhard, W., R.G. Webster, 1978:
Antigenic drift in influenza A viruses.
I. Selection and characterization of antigenic variants of A/PR/8/34 (H0N1) influenza virus with monoclonal antibodies.
J. Exp. Med. 148, 383-392

- Ghendon, Y., A. Klimov, N. Gorodkova, L. Döhner, 1981:
Genome analysis of influenza virus strains isolated
during an epidemic of 1979-1980.
J. Gen. Virol. 56, 303-313
- Hay, A.J., B. Lomniczi, A.R. Bellamy, J.J. Skehel, 1977:
Transcription of the influenza virus genome.
Virology 83, 337-355
- Hinshaw, V.S., C.W. Naeve, R.G. Webster, A. Douglas,
J.J. Skehel, J. Bryans, 1983:
Analysis of antigenic variation in equine 2 influenza A
viruses.
Bull. Wld. Hlth. Org. 61, 153-158
- Huang, R.T.C., K. Wahn, H.D. Klenk, R. Rott, 1980a:
Fusion between cell membrane and liposomes containing
the glycoproteins of influenza virus.
Virology 104, 294-302
- Huang, R.T.C., R. Rott, K. Wahn, H.D. Klenk, T. Kohama, 1980b:
The function of the neuraminidase in membrane fusion
induced by myxoviruses.
Virology 107, 313-319
- Hübert, P., 1985:
Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen
Rotaviren und ihre Anwendung in der Diagnostik.
Vet. Med. Diss., München
- Jackson, D.C., A. Nestorowicz, 1985:
Antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin.
XI. Conformational changes detected by monoclonal anti-
bodies.
Virology 145, 72-83

- Jackson, D.C., J.M. Murray, E.M. Anders, D.O. White,
R.G. Webster, L.E. Brown, 1983:
Expression of a unique antigenic determinant of influenza virus hemagglutinin at pH 5.
In: The Origin of pandemic influenza viruses,
Laver, W.G. (ed.), Elsevier, New York, 29-38
- Jerne, N.K., 1960:
Immunological speculations.
Ann. Rev. Microbiol. 14, 314-358
- John, T.J., V.A. Fulginiti, 1966:
Parainfluenza 2 virus: increase in hemagglutinin titer
on treatment with Tween 80 and ether.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 109-111
- Kasel, J.A., R.B. Couch, 1969:
Experimental infection in man and horses with influenza A
viruses.
Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 447-452
- Kearney, J.F., A. Radbruch, B. Liesegang, K. Rajewsky, 1979:
A new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin
expression but permits the construction of antibody secreting
cell lines.
J. Immun. 123, 1548-1550
- Kida, H., L.E. Brown, R.G. Webster, 1982:
Biological activity of monoclonal antibodies to operationally
defined antigenic regions on the hemagglutinin molecule of
A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) influenza virus.
Virology 122, 38-47
- Kilbourne, E.D., W.G. Laver, J.L. Schulman, R.G. Webster, 1968:
Antiviral activity of antiserum specific for an influenza
virus neuraminidase.
J. Virol. 2, 281-288

Klenk, H.D., R. Rott, M. Orlich, 1977:

Further studies on the activation of influenza virus by proteolytic cleavage of the hemagglutinin.

J. Gen. Virol. 36, 151-161

Klenk, H.D., W. Garten, F.X. Bosch, R. Rott, 1982:

Viral glycoproteins as determinants of pathogenicity.

Med. Microbiol. Immun. 170, 145-153

Klingeborn, B., G. Rockborn, Z. Dinter, 1980:

Significant antigenic drift within the influenza equi 2 subtype in Sweden.

Vet. Rec. 106, 363-364

Köhler, G., L. Milstein, 1975:

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature 256, 495-497

Lämmli, U.K., 1970:

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227, 680-685

Laver, W.G., G.M. Air, R.G. Webster, W. Gerhard, C.W. Ward, T.A.A. Dopheide, 1979:

Antigenic drift in type A influenza virus: sequence differences in the hemagglutinin of HongKong (H3N2) variants selected with monoclonal hybridoma antibodies.

Virology 98, 226-237

Laver, W.G., G.M. Air, T.A.A. Dopheide, C.W. Ward, 1980:

Amino acid sequence changes in the hemagglutinin of A/HongKong (H3N2) influenza virus during the period 1968-77.

Nature 283, 454-457

- Liu, J.K.M., D.R. Pascoe, L.W.S. Chang, Y.C. Zee, 1985:
Duration of maternally derived antibodies against
equine influenza in newborn foals.
Am. J. Vet. Res. 46, 2078-2080
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, L. Farr, R.J. Randall, 1951:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265
- Lubeck, M., W. Gerhard, 1982:
Conformational changes at topologically distinct anti-
genic sites on the influenza A/PR/8/34 virus HA mole-
cule are induced by the binding of monoclonal antibodies.
Virology 118, 1-7
- Marsh, M., 1984:
The entry of enveloped viruses into cells by endocytosis.
Biochem. J. 218, 1-10
- Mayr, A., 1970:
Schutzimpfung gegen Pferdeinfluenza.
Tierärztl. Umschau 25, 63-65
- Mayr, A., P.A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann, 1974:
Virologische Arbeitsmethoden I
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- McGeoch, D., P. Fellner, C. Newton, 1976:
Influenza virus genome consists of eight distinct RNA
species.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 3045-3049
- Mumford, J., J.M. Wood, A.M. Scott, C. Folkers, G.C. Schild,
1983:
Studies with inactivated equine influenza vaccine.
2. Protection against experimental infection with in-
fluenza virus A/Eq/Newmarket/79 (H3N8).
J. Hyg. 90, 385-395

Nath, D.M., H.C. Minocha, 1977:

Replication of swine and equine influenza viruses in canine kidney cells.

Am. J. Vet. Res. 38, 1059-1061

Nerome, K., M. Ishida, S. Sakamoto, M. Sako, S. Nonaka, R.G. Webster, A. Oya, 1983:

The possible origin of swine (H1N1) influenza virus in the swine population of Japan and genome composition of a recombinant (H1N2) virus.

In: The origin of pandemic influenza viruses, Laver, W.G. (ed.), Elsevier, New York, 201-210

Pahud, J.J., J.P. Mach, 1972:

Equine secretory IgA and secretory component.

Int. Arch. Allerg. 42, 175-179

Palese, P., M.B. Ritchey, I.L. Schulman, 1977:

Mapping of the influenza virus genome.

II. Identification of the P1, P2, P3 genes.

Virology 76, 114-121

Palmer, D.F., W.R. Dowdle, M.T. Coleman, G.C. Schild, 1975:

Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis.

U.S. Department of Health, Education and Welfare
Immunology Series No.6

Pereira, H.G., S. Takimoto, N.S. Piegas, L.A. Ribeiro do Valle, 1972:

Antigenic variation of equine (Heq2Neq2) influenzavirus.

Bull. Wld. Hlth. Org. 47, 465-469

Pereira, M.S., P. Chakraverty, P. Cunningham, R.G. Webster, 1985:

The use of monoclonal antibodies for the antigenic analysis of influenza A viruses.

Bull. Wld. Hlth. Org. 63, 265-271

Pollock, R.R., J.-L. Teillaud, M.D. Scharff, 1984:

Monoclonal antibodies: A powerful tool for selecting and analyzing mutations in antigens and antibodies.

Ann. Rev. Microbiol. 38, 389-417

Powell, D.G., G.R. Thomson, P. Spooner, W. Plowright, R. Burrows, G.C. Schild, 1974:

The outbreak of equine influenza in England April/May 1973.

Vet. Rec. 94, 282-287

Rhode W., E. Harms, C. Scholtissek, 1977:

Biochemical studies on influenza viruses.

I. Comparative analysis of equine 2 virus and virus N gene products.

Virology 79, 393-404

Rickwood, D., B.D. Hames (eds.), 1982:

Gel electrophoresis of nucleic acids: A practical approach.

JRL Press Ltd., Oxford/Washington DC

Rose, M.A., R. Hopes, P.D. Rosdale, W.J.B. Beveridge, 1974:

Virus infections of horses at Newmarket, 1972 and 1973.

Vet. Rec. 95, 484-488

Schild, G.C., 1972:

Evidence for a new type-specific structural antigen of the influenza virus particle.

J. Gen. Virol. 15, 99-103

Schild, G.C., W.D. Winter, C.M. Brand, 1971:

Serological diagnosis of human influenza infections by immunoprecipitin techniques.

Bull. Wld. Hlth. Org. 45, 465-471

Schild, G.C., M.S. Pereira, P. Chakraverty, 1975:

Single-radial-haemolysis: a new method for the assay of antibody to influenza haemagglutinin. Applications for diagnosis and seroepidemiologic surveillance of influenza.

Bull. Wld. Hlth. Org. 52, 43-50

Schild, G.C., R.W. Newman, R.G. Webster, D. Major, V.S. Hinshaw, 1980:

Antigenic analysis of influenza A surface antigens: considerations for the nomenclature of influenza virus. Arch. Virol. 63, 171-184

Scholtissek, C., 1980:

The structure of the hemagglutinin and neuraminidase genes as revealed by molecular hybridization.

In: Structure and variation in influenza virus, Laver, W.G., Air, G.M. (eds.), Elsevier, New York, 191-200

Scholtissek, C., E. Harms, W. Rhode, M. Orlich, R. Rott, 1976:

Correlation between RNA fragments of fowl plaque virus and their corresponding gene functions.

Virology 74, 332-344

Scholtissek, C., W. Rhode, E. Harms, R. Rott, 1977:

Correlation between base sequence homology of RNA segment 4 and antigenicity of the hemagglutinin of influenza viruses.

Virology 79, 330-336

Sovinova, O., B. Tumova, F. Poustka, J. Nemec, 1958:

Isolation of a virus causing respiratory disease in horses.

Acta Virol. 2, 52-61

Sriram, G., W.J. Bean, Jr., V.S. Hinshaw, R.G. Webster, 1980:

Genetic diversity among avian influenza viruses.

Virology 105, 592-599

Tappert, H., 1981:

Versuche zur Produktion von monoklonalen Antikörpern gegen Rotaviren.

Vet. Med. Diss., München

Thein, P., 1982:

Immunprophylaxe beim Pferd.

Prakt. Tierarzt 63, 49-52

- Thomson, G.R., J.A. Mumford, P.R. Spooner, R. Burrows,
D.G. Powell, 1977:
The outbreak of equine influenza in England: January
1976.
Vet. Rec. 100, 465-468
- Tumova, B., 1980:
Equine influenza - A segment in influenza virus ecology.
Comp. Immun. Microbiol. Inf. Dis. 3, 45-59
- Tumova, B., A. Stumpa, J. Zakopal, D. Veznikova, J. Mensik,
1980:
Persistence in nature of influenza virus A/eq/Praha/56
(Heg1Neq1).
Acta Virol. 24, 63-67
- Tumova, B., C.L. Hannoun, P.A. Bachmann, M. Bonneau, 1982:
Organisation of worldwide surveillance of equine in-
fluenza.
II. Experts reviews and discussions.
Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1, 457-467
- Underwood, P.A., 1982:
Mapping of antigenic changes in the haemagglutinin of
HongKong influenza (H3N2) strains using a large panel
of monoclonal antibodies.
J. Gen. Virol. 62, 153-169
- Varghese, J.N., W.G. Laver, P.M. Colman, 1983:
Structure of the influenza virus glycoprotein antigen
neuraminidase at 2.9 Å resolution.
Nature, 303, 35-40
- de Wachter, R., W. Fiers, 1972:
Preparative two-dimensional polyacrylamide gel electro-
phoresis of ³²P-labeled RNA.
Anal. Biochem. 49, 184-197

Waddel, G.H., M.B. Teigland, M.M. Sigel, 1963:

A new influenza virus associated with equine respiratory disease.

J. Am. Vet. Med. Ass. 143, 587-590

Ward, C.W., 1981:

Structure of the influenza virus hemagglutinin.

Curr. Top. Microbiol. Immun. 94, 1-74

Ward, C.W., T.A. Dopheide, 1980:

The HongKong (H3) haemagglutinin. Complete amino acid sequence and oligosaccharide distribution for the heavy chain of A/Memphis/102/72.

In: Structure and variation in influenza virus,

Laver, W.G., Air, G.M., (eds.), Elsevier, New York, 27-38

Ward, C.W., T.A.A. Dopheide, 1981:

The HongKong hemagglutinin. Structural relationships between the human (H3) hemagglutinins and the hemagglutinin from the putative progenitor strain A/Duck/Ukraine/1/63 (Hav7).

In: Genetic variation among influenza viruses, Nayak, D., Fox, C.F. (eds.), Academic Press, Inc., New York, 323-340

Webster, R.G., W.G. Laver, 1980:

Determination of the number of non-overlapping antigenic areas on HongKong (H3N2) influenza virus haemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance.

Virology 104, 139-148

Webster, R.G., W.G. Laver, G.M. Air, G.C. Schild, 1982a:

Molecular mechanisms of variation in influenza viruses.

Nature 296, 115-121

Webster, R.G., V.S. Hinshaw, W.G. Laver, 1982b:

Selection and analysis of antigenic variants of the neuraminidase of N2 influenza viruses with monoclonal antibodies.

Virology 117, 93-104

Webster, R.G., L.E. Brown, W.G. Laver, 1984:

Antigenic and biological characterization of influenza virus neuraminidase (N2) with monoclonal antibodies.
Virology 135, 30-42

Wiley, D.C., 1983:

Neuraminidase of influenza virus reveals a flower-like head.
Nature 303, 19-20

Wiley, D.C., I.A. Wilson, J.J. Skehel, 1981:

Structural identification of the antibody-binding sites of HongKong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation.
Nature 289, 373-378

Wilson, I.A., J.J. Skehel, D.C. Wiley, 1981:

Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.
Nature 289, 366-373

Witherspoon, D.M., 1984:

Vaccination against equine herpesvirus 1 and equine influenza infection.
Vet. Rec. 115, 363

Wood, J.M., J. Mumford, C. Folkers, A.M. Scott, G.C. Schild, 1983:

Studies with inactivated equine influenza vaccine.
1. Serological responses of ponies to graded doses of vaccine.
J. Hyg. 90, 371-384

v.Wyke, K.L., V.S. Hinshaw, W.J. Bean, Jr., R.G. Webster, 1980:

Antigenic variation of influenza A virus nucleoprotein detected with monoclonal antibodies.
J. Virol. 35, 24-30

Yamagishi, H., T. Nagamine, K. Shimoda, S. Ide, Y. Igarashi,
I. Yoshioka, M. Matumoto, 1981:

Infectivity assay and neutralization test for equine
influenza virus in microplate cell cultures.

Vet. Microbiol. 6, 309-315

Yamagishi, H., T. Nagamine, K. Shimoda, S. Ide, Y. Igarashi,
I. Yoshioka, M. Matumoto, 1982:

Comparative measurement of equine influenza virus anti-
bodies in horse sera by single radial haemolysis, neu-
tralization and haemagglutinin inhibition tests.

J. Clin. Microbiol. 15, 660-662

Yewdell, J.W., W. Gerhard, 1981:

Antigenic characterization of viruses by monoclonal
antibodies.

Ann. Rev. Microbiol. 35, 185-206

Yoden, S., H. Kida, R. Yanagawa, 1985:

Is bivalent binding of monoclonal antibodies to dif-
ferent antigenic areas on the haemagglutinin of influ-
enza virus required for neutralisation of viral
infectivity?

Arch. Virol. 85, 209-216

Volken, R.H., 1983:

Use of monoclonal antibodies for viral diagnosis.

Curr. Top. Microbiol. Immun. 104, 177-195

Herr Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme des Themas.

Besonders in Erinnerung behalten möchte ich Herrn Prof. Dr. P.A. Bachmann, der durch seinen jederzeit gewährten Rat und seine bereitwillige Unterstützung in der kurzen verbliebenen Zeit, viel zum Gelingen der Bearbeitung des Themas beigetragen hat.

Herrn Dr. W. Eichhorn danke ich für das Interesse und die vielen Hinweise bei der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Dr. P. Hübert, Herrn Dr. H. Meyer, Herrn Dr. Claus Czerny und allen Mitarbeitern der Isolierabteilung danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stete Unterstützung.

Susanne danke ich für Korrekturlesen und seelische Unterstützung.

Lebenslauf

Am 23.2.1959 wurde ich, Thomas Martin Noé, als Sohn des Berufsschullehrers Heinrich Noé und seiner Frau Elisabeth, geb. Theissing, in Würzburg geboren.

Nach 4 Jahren Grundschule (1965-1969) in Rimpfart trat ich auf das Riemenschneider-Gymnasium in Würzburg über, an dem ich im Juni 1978 die Reifeprüfung ablegte.

Nach Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich im Wintersemester 1979/80 mit meinem Tiermedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Am 30. November 1984 schloß ich das Staatsexamen ab.

Im Januar 1985 begann ich mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation.

Mit Geltung vom 10. April 1985 wurde mir die Approbation als Tierarzt erteilt.

